

Aus dem Interdisziplinären Medizinischen Zentrum, Abteilung Neuropathologie

Direktor: Prof. Dr. Axel Pagenstecher

des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg

Entwicklung eines Mausmodells für die intrazerebrale Induktion einer zerebralen Immunreaktion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ludmilla Wegent

aus Jalty

Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 29.06.2018
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. A. Pagenstecher

1.Korreferent: Frau Prof. Dr. M. Huber

Für meine Jungs Alexander und Carl

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Multiple Sklerose.....	3
1.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	4
1.3 Immunologie Hintergrund	5
1.3.1 Interleukine 12 und 23.....	5
1.3.2 Transforming Growth Factor- β	6
1.3.3 Antigenpräsentation	6
1.4 Intrazerebrale Induktion einer zerebralen Immunreaktion anhand des EAE-Modells bei der CA-Tierlinie.....	10
1.5 Ziele der Arbeit	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	14
2.2 Puffer und Lösungen	14
2.3 Versuchstiere	16
2.3.1 IL-12p40 ^{-/-} -Tierlinie	16
2.3.2 CA-Tierlinie.....	16
2.3.3 MyD88 ^{-/-} -Tierlinie.....	16
2.4 Genotypisierung.....	18
2.4.1 DNA-Isolierung	18
2.4.2 PCR	19
2.4.3 Gelelektrophorese	21
2.5 Emulsion	23
2.6 Stereotaktische Operationen.....	25
2.6.1 Operationsmaterialien	25
2.6.2 Durchführung der stereotaktischen Operationen	26
2.6.3 α -TGF- β	29
2.6.4 Pertussis Toxin.....	29
2.6.5 CD4+2D2-Lymphozyten.....	29
2.7 Klinische Verlaufskontrollen	30
2.7.1 Operationsserien	30
2.8 Morphologie	34
2.8.1 Histopathologische Untersuchung	34
2.8.1.1 Haemotoxylin-Eosin Färbung.....	35
2.8.1.2 Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase Färbung	35
2.8.2 Immunhistochemie	36
2.9 Lymphozytenextraktion	38
2.10 Durchflusszytometrie	40
2.10.1 Oberflächenfärbung.....	40
2.10.2 Formaldehydfixierung und Intrazelluläre Färbung	41
3 Ergebnisse	42
3.1 Etablierung eines Mausmodells zur intrazerebral induzierten zerebralen Immunreaktion	42
3.1.1 Koordinaten für die ZNS Injektion	42
3.1.2 Herstellung und Zusammensetzung der Emulsion	43
3.1.3 Prozedere zur intrazerebellären Injektion der α -TGF- β -Lösung	44
3.2 Ergebnisse der Operationsserien	45

3.2.1 Serien 1-4.....	45
3.2.2 Serie 5.....	46
3.2.3 Serie 6.....	49
3.2.4 Serie 7.....	50
3.3 Morphologie	53
3.3.1 HE- und CAE-Färbungen	53
3.3.2 Immunhistochemie	54
3.4 FACS-Analyse.....	58
3.4.1 FACS-Analyse nach 5 stündiger Stimulation.....	58
3.4.2 FACS Analyse nach 18 stündiger Stimulation	61
4 Diskussion	65
4.1 Etablierung des Modells.....	66
4.2 Klinische Symptomatik der operierten Versuchstiere	68
4.3 Ursache der zervikalen Granulom-artigen Läsionen	70
4.4 Morphologische Veränderungen infolge einer Inflammation	71
4.5 FACS Analysen	72
4.6 Ist die Induktion einer zerebralen Immunreaktion gelungen?.....	74
4.7 Aussicht.....	77
5 Zusammenfassung	78
6 Summary	80
7 Literaturverzeichnis	82
8 Anhang.....	91
9 Abkürzungsverzeichnis	93
10 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	97
11 Danksagung.....	98

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Dabei kommt es zu fokalen inflammatorisch demyelinisierenden Läsionen in der weißen Substanz des ZNS, die sich beispielsweise in MRT Untersuchungen darstellen lassen. Diese Läsionen sind neuropathologisch durch T-Zellinfiltration sowie Zerstörung der Myelinscheiden mit nachfolgender reaktiver Gliose gekennzeichnet. Die T-Zellen sind gegen körpereigene Antigene wie z.B. das basische Myelinprotein (MBP) oder Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) gerichtet (61). Auf Grund der eingeschränkten Nervenleitgeschwindigkeit infolge der Myelinzerstörung äußert sich die Erkrankung klinisch in vielfältiger Form wie beispielsweise Lähmungserscheinungen, Sensibilitäts- und Gleichgewichtsstörungen sowie kognitiven Defiziten (37, 99). Bis heute ist die Ätiologie der MS nicht geklärt. Eine der diversen Hypothesen besagt, dass eine extrakranielle venöse Obstruktion die Entstehung der Erkrankung begünstigt (27, 90, 96). Van der Mei et al fanden hingegen einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhter Sonnenexposition sowie höheren Vitamin-D Konzentrationen im Blut und einem damit einhergehenden geringeren Risiko an MS zu erkranken (106). Die Hygienehypothese wiederum besagt, dass eine erhöhte Anzahl an Infektionen sowie Zusammenleben mit Geschwistern bis zum sechsten Lebensjahr das Risiko für MS senkt. Epidemiologische Studien belegen diese Hypothese und zeigen, dass durch vermehrte Infektionen bakterieller, viraler oder parasitärer Genese in der Kindheit das Risiko später eine Autoimmunerkrankung zu entwickeln deutlich geringer ausfällt (35, 83). Bei der weit verbreiteten Virustheorie geht man davon aus, dass im Rahmen einer Infektion T- oder B-Zellen aktiviert werden, welche auch Myelinproteine erkennen (molecular mimicry) und die Krankheit so induzieren (2, 57). Durch die Ähnlichkeit der viralen Erreger-Antigene zu den körpereigenen Bausteinen wie MOG oder MBP, richten sich T-Zellen gegen diese Myelinproteine und verursachen so autoimmune Gewebeerstörung (18). Darüber hinaus kommen genetische Faktoren wie Genpolymorphismen des Interleukin Signalweges, HLA-Typ HLA-DRB1 oder TNFR1-Variante für das Auftreten von MS in Betracht. So konnte in Studien mit eineiigen Zwillingen eine Konkordanzrate von 25-30% gezeigt werden (109).

1.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Die EAE ist ein Tiermodell für die Multiple Sklerose. Durch die Imitation der humanen Erkrankung wird es möglich, verschiedene Faktoren und Mechanismen zu untersuchen, die für die Pathogenese entscheidend sein könnten. Außerdem lassen sich im Tiermodell Gene verändern, um so deren Einfluss auf die Erkrankung bzw. deren Verlauf untersuchen zu können (15, 61, 70). Bei der EAE wird den Versuchstieren ein Myelin-Peptid, z.B. MOG, gelöst in komplettem Freund-Adjuvans subkutan z.B. über den Flanken injiziert. Das komplette Freund-Adjuvans ist eine Emulsion aus einer öligen und wässrigen Phase (1:1) in der sich gleichmäßig verteilt, durch Hitze inaktiviertes Mykobakterium tuberculosis (MT) befindet (71). Das MT wird von Makrophagen sowie dendritischen Zellen erkannt und phagozytiert, wodurch die Synthese von IL-12 angeregt wird, welches wiederum zu einer ausgeprägten Th1-Antwort führt (77). Zusätzlich regen die Zellwandbestandteile von MT die IFN- γ Produktion an und verstärken damit die ausgelöste Th1-Immunantwort (39). Bei der Prozessierung der Emulsion werden die MOG- sowie MT-Bestandteile mit Hilfe von MHC II (major histocompatibility complex) Molekülen an der Oberfläche von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) exprimiert.

Zusätzlich kann bei der EAE-Induktion das Pertussis toxin (Ptx) verabreicht werden. Ptx stammt aus dem gramnegativen Bakterium *Bordetella pertussis* und kann intrazellulär ablaufende Signalprozesse über G-Proteine irreversibel blockieren (14). Der genaue Wirkmechanismus von Ptx bei EAE ist nicht vollständig geklärt. Bisher geht man davon aus, dass Ptx die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) erhöht und so autoreaktiven T-Zellen die Migration in das ZNS ermöglicht. Neuere Studien zeigen, dass Ptx Metalloproteinasen aktiviert sowie eine Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF und damit die parenchymale ZNS-Infiltration induziert (4, 95, 100, 116). Im ZNS interagieren die T-Zellen mit Mikroglia, welche dort Makrophagen-ähnliche Funktionen haben und im Normalzustand MHC II Moleküle auf niedrigem Level sowie Peptidfragmente des Myelins exprimieren. Diese Myelinfragmente werden von den eingewanderten T-Effektorzellen erkannt und die Entzündung so durch z.B. IFN- γ Produktion weiter verstärkt (6, 17, 72). Die Entzündung findet v.a. im Kleinhirn und Rückenmark statt. Bei den Versuchstieren äußert sich diese in Form von progressiven Lähmungen, welche meistens am Schwanz und den Hinterbeinen beginnt und im Extremfall tödlich enden kann.

1.3 Immunologie Hintergrund

Wie oben beschrieben, spielen die Interleukine IL-12 und IL-23 eine herausragende Rolle bei der EAE-Induktion, indem sie eine Differenzierung von naiven CD4⁺T-Zellen bewirken. Allgemein fungieren die Interleukine als Vermittler zwischen den Zellen des Immunsystems und können bspw. eine Inflammation induzieren (41, 65, 101). Bei der EAE konnte in Experimenten gezeigt werden, dass bei Gabe von Antikörpern gegen IL-12 bzw. IL-23 der Verlauf stark abgemildert oder die Induktion sogar verhindert werden kann (20, 23, 64, 73).

1.3.1 Interleukine 12 und 23

Das Interleukin 12 ist ein Schlüsselmolekül zur Regulation der angeborenen und erworbenen Immunantwort (19, 110). Die Hauptproduktionszellen des Interleukins sind Makrophagen und dendritische Zellen, im ZNS sind es v.a. die Mikroglia und die Astrozyten (22, 68, 94, 103, 104). Eine entscheidende Funktion kommt IL-12 in der Stimulation von Th0-Zellen zu. Hier bewirkt IL-12 eine Differenzierung der Lymphozyten zu Th1-Helferzellen, die in der Immunantwort gegen Fremdartigene wie Viren, Bakterien oder Tumorantigene sowie im Verlauf von Autoimmunerkrankungen, entscheidende Effektorzellen sind (47). Die Differenzierung zu Th2-Zellen wird hingegen durch IL-12 gehemmt (75).

IL-12 setzt sich aus den Untereinheiten p40 und p35 zusammen, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (*siehe Abb. 1.1*). Insgesamt hat das Molekül ein Gewicht von 70kDa. Um biologisch aktives IL-12 synthetisieren zu können, muss eine Zelle die mRNA für beide Untereinheiten besitzen (91). Die als Homodimer vorliegende Untereinheit p40 kann zudem als kompetitiver Antagonist des IL-12 fungieren (73). Die p40 Untereinheit ist außerdem ein Teil von IL-23 (10). Dieses ist ein Heterodimer aus p40 und p19 und hat eine ähnliche Funktion wie IL-12 (79). Bei einer Gendeletion für p40 kann die Zelle dementsprechend weder IL-12 noch IL-23 synthetisieren. Die Anwesenheit von IL-23 ist zusammen mit TGF- β und IL-6 entscheidend für die Differenzierung von Th0-Zellen zu Th17-Zellen, die durch die Produktion von IL-17 charakterisiert sind (41, 42). Dieses induziert eine entzündungsfördernde Zytokinproduktion von IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , TGF- β und TNF- α bei Epithelien, Endothelien und Fibroblasten und ist maßgeblich an der Pathogenese der EAE beteiligt (31, 54, 113).

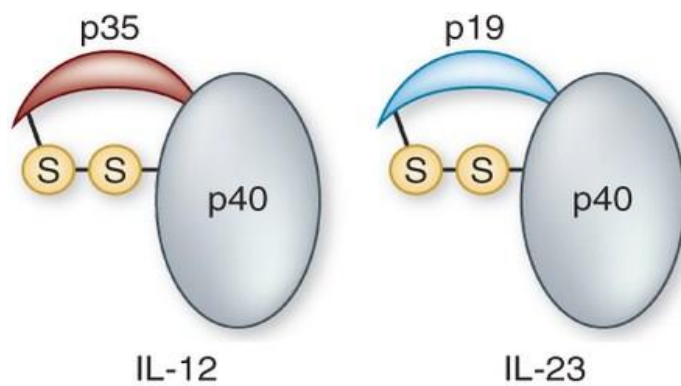


Abb. 1.1 Interleukine 12 und 23. Beide Interleukine bestehen aus je zwei Untereinheiten, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die p40-Untereinheit ist bei den IL-12 und IL-23 gleich (118).

1.3.2 Transforming Growth Factor- β

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ist ein Zytokin, das besonders in der Embryonalentwicklung u. a. Zellwachstum, -differenzierung, -homöostase und Apoptose über die Transkription der DNA durch die SMAD-Signalkaskade reguliert. Es wird u.a. von Chondrozyten, Monozyten und T-Zellen gebildet und hat Einfluss auf das Immunsystem, indem es die Differenzierung von CD4⁺Th0-Zellen zu regulatorischen T-Zellen (Treg) bewirkt. Die Funktion von Th1-Zellen kann durch TGF- β unterdrückt werden, indem die Zellen im G1-Arrest verbleiben oder die Zellapoptose eingeleitet wird (33, 78, 115). Bei Mäusen mit einer Gendeletion des TGF- β fehlt die regulierende Wirkung auf die T-Zellen, so dass es zu einer überschießenden Immunantwort wie beispielsweise einer Ösophagitis mit letalem Ausgang kommen kann. In den Studien von Yaswen et al wurde gezeigt, dass TGF- β in vivo die Induktion einer EAE verhindern kann (114).

1.3.3 Antigenpräsentation

Die T-Zellen sind Effektorzellen der adaptiven Immunantwort, welche Infektionen des Wirtes durch Bakterien, Viren oder Parasiten abwehren. Nach Reifung im Thymus differenzieren sie zu CD (Cluster of differentiation) 4⁺ oder CD8⁺T-Zellen, die dann jeweils für ein bestimmtes Antigen spezifisch sind. Anschließend gelangen die naiven T-Zellen durch die Blutzirkulation zu sekundären Lymphorganen wie den Lymphknoten

oder der Milz, wo ihnen von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen Antigene präsentiert werden. Die Aktivierung der T-Zelle erfolgt durch drei Signale. Das erste Signal ist die antigenspezifische Aktivierung des membrangebundenen T-Zell-Rezeptors. Die Antigenerkennung verläuft durch Bindung eines Antigens an die dafür spezifischen MHC-Glykoproteine auf Zelloberflächen, die dann mit dem passenden T-Zell-Rezeptor interagieren. So ist jeder T-Zell-Rezeptor spezifisch für eine besondere Kombination aus einem Peptid-Antigen und einem MHC Molekül. Die T-Zellen mit dem Korezeptor CD4 reagieren mit MHC Klasse II (B-Lymphozyten, dendritische Zellen und Makrophagen, Mikroglia) und die T-Zellen mit dem Korezeptor CD8 mit MHC Klasse I (alle Zellkernhaltigen Zellen). Während die CD8+T-Zellen zytotoxisch sind und Erreger-infizierte Zellen direkt abtöten können, haben die CD4+T-Zellen eher eine übergeordnete steuernde Funktion der Immunreaktion und sind in der Lage weitere Zellen mit Hilfe von Interleukinen zu aktivieren.

Das zweite Signal entsteht durch die Wechselwirkung von co-stimulierenden Molekülen wie z.B. B7.1 und B7.2 sowie ICOS oder CD40 auf Antigen-präsentierenden Zellen, die mit den entsprechenden Liganden auf den T-Zellen, CD28, LICOS, CD40L und CTLA-4, interagieren. Das B7 Protein interagiert mit 2 Korezeptoren, CD28 und CTLA-4, wobei es zu letzterem eine 20fach höhere Affinität hat und somit zum inhibitorischen Signal der T-Zellen führt (76).

Das letzte Signal vermitteln Zytokine, die die Differenzierung der T-Zellen induzieren (*siehe Tabelle 1.3*). In vielen Experimenten wurde nachgewiesen, dass die CD4+T-Zellen, welche zu Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Zellen differenzieren können (51), bei der Pathogenese der EAE und MS entscheidend sind (56, 116). Durch adoptiven Transfer wurde zudem gezeigt, dass v.a. die Th1- und die Th17-Lymphozyten ausschlaggebend für die Entstehung einer EAE sind (38). Zu welcher Untergruppe sich die Zellen entwickeln, hängt vom Zytokinmilieu ab (55, 75, 117). So führen IL-12 und IFN- γ durch die Stimulation des JAK-STAT Signalwegs zur Differenzierung der Th0-Zellen zu Th1-Zellen mit einer anschließenden Aktivierung der Gentranskription des IL-12 Rezeptors und für IFN- γ (76, 111). IFN- γ wiederum bildet einen positiven Feedback-Mechanismus und führt so zu einer gesteigerten Produktion von IL-12 (3, 36). Weitere Hauptfunktionen einer aktivierten Th1-Zelle sind die Produktion von TNF- α und IL-2 (8, 69). In Anwesenheit von IL-23, IL-6 und TGF- β entwickeln sich die Lymphozyten zu Th17-Zellen, welche IL-17 sezernieren, das u.a. die Freisetzung von Chemokinen aktiviert (11, 47, 58, 103).

ZYTOKIN	FUNKTION
IFN-γ	Aktivierung von Makrophagen, Differenzierung zu CD4+Th1-Zellen oder Effektor CD8+T-Zellen und Hemmung der Th2-Antwort
TNF-α	Stimulation der Entzündungsreaktion
IL-12	Differenzierung von CD4+T-Zellen zu Th1-Zellen, Differenzierung von CD8+T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen, Aktivierung von CD56+ (nur im Menschen) NK-Zellen zur Produktion von IFN- γ , Stimulation der Bildung von Th1-Zytokinen und Hemmung der Th2-Antwort
IL-17	Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und Stimulation von Fibroblasten und Epithelzellen zur Freisetzung von Chemokinen

Tabelle 1.1 Darstellung der für die EAE entscheidenden Zytokine und deren Funktion (76).

Nach der Aktivierung verlässt die nun reife T-Zelle das Lymphsystem und kann ihre jeweilige Funktion erfüllen (*siehe Tabelle 1.2*). Speziell bei der MS kommt es zur Aktivierung von Makrophagen sowie residenter Mikroglia, die durch Zytokinausschüttung eine Inflammation induzieren (32). Durch die Beteiligung von B-Zellen kommt es zur antikörpervermittelten Destruktion der Myelinscheiden. Zudem werden durch Glutamat- und NO-Freisetzung die Oligodendrozyten unspezifisch zerstört (102).

T-Zelle	Funktion
CD8+	Zytotoxisch
CD4+Th1	Aktivierung von Makrophagen und Unterstützung der B-Zellen bei der Antikörperproduktion, speziell IgG-AK
CD4+Th2	Reaktion auf Parasiten, Unterstützung der B-Zellen bei der Antikörperproduktion, speziell IgE-AK, Kontrolle der humoralen Immunität
CD4+Th17	Abwehr gegen extrazelluläre Bakterien, Verstärkung der Reaktion von neutrophilen Zellen, Aufrechterhaltung der Schleimhautimmunität und Barriereintegrität, pathogenetische Zellen bei der EAE, Ausbildung einer atypischen EAE (87)
CD4+Treg	Suppression der T-Zell-Proliferation durch Produktion von IL-10 und TGF- β , Hemmung der Produktion von IL-12 und damit der Differenzierung zu Th1-Zellen, Unterdrückung der Immunantwort (16)

Tabelle 1.2 Darstellung von T-Lymphozyten und deren Funktion (76).

Signal	Kaskade	Produzierte Interleukine	Differenzierte T-Zellen
TGF-β	Fox-P3	TGF- β und IL-10	Treg-Zellen
TGF-β, IL-6, IL-23	ROR γ T	IL-6 und IL-17	Th17-Zellen
IL-12, IFN-γ	T-bet	IL-2 und IFN- γ	Th1-Zellen
IL-4	GATA-3	IL-4 und IL-5	Th2-Zellen

Tabelle 1.3 Darstellung von Signal 3 bei Antigenpräsentation. Je nach Zytokin und entsprechender Signalkaskade kommt es zu einer Differenzierung bestimmter CD4+T-Zellen (7, 76).

1.4 Intrazerebrale Induktion einer zerebralen Immunreaktion anhand des EAE-Modells bei der CA-Tierlinie

Die Induktion einer EAE, wie oben beschrieben, ist gut etabliert und wird in der Forschung vielfach angewendet. In dieser Arbeit wandelten wir die „klassische EAE“ ab, um zu untersuchen, ob das ZNS unter bestimmten Umständen ein immunkompetentes Organ sein kann und in unserem Fall eine spezifische Immunreaktion gegen das MOG allein auf der ZNS-Ebene induzierbar ist. Zum einen bedeutete dieser Ansatz, dass das periphere Immunsystem nicht bei der Induktion beteiligt sein darf, zum anderen muss die Injektion direkt in das ZNS erfolgen und nicht wie etabliert in die Flanken der Versuchstiere.

Das Immunsystem des ZNS zeigt im Vergleich zu den peripheren Organen zwei wichtige Unterschiede. Die BHS verhindert, dass hydrophile Moleküle sowie Immunzellen ungehindert in das ZNS eindringen können. Zudem gibt es keine klassischen Lymphgefäße (34, 81). Findet eine Entzündung im ZNS statt, läuft diese nicht nach dem gleichen Schema ab wie in den übrigen Organsystemen. Die Antigene können dabei nicht auf dem Lymphweg zu den sekundären Lymphorganen gelangen, sondern drainieren über die Lamina cribrosa des Os ethmoidale oder durch die Gliascheiden der Hirnnerven in die zervikalen Lymphknoten und interagieren dort mit den T-Zellen (17, 43, 108). Obwohl dem ZNS das klassische Lymphsystem fehlt, zeigen neueste Untersuchungen, dass Lymphgefäß-ähnliche Bahnen in der Hirnhaut existieren, welche parallel zu den Sinus laufen und Anschluss an die zervikalen Lymphknoten haben. Die Interaktion zwischen dem ZNS und dem peripheren Immunsystem muss jedoch weiter untersucht werden (86).

Früher ging man davon aus, dass lediglich die sogenannte IL-12/Th1-Achse eine wichtige Rolle in der Pathogenese der EAE spielt. Es ließ sich dabei jedoch nicht erklären warum Versuchstiere mit einer Gendelektion für die p35-Untereinheit gegenüber einer EAE-Induktion anfällig waren, wohingegen Tiere mit einer p40-Deletion sich resistent zeigten. Eine Erklärung gibt die IL-23/Th17-Achse. Da bei einer Deletion der p40-Untereinheit sowohl IL-12 als auch IL-23 nicht synthetisiert werden können, findet die für die EAE entscheidende Aktivierung der T-Zellen nicht mehr statt. Die Unabdingbarkeit von IL-23 bei EAE wurde bei Tieren mit Deletion der p19-Untereinheit sicher festgestellt, da diese ebenfalls keine EAE entwickeln konnten (30). Für die Differenzierung der Th0-Zellen zu Th17-Zellen reichen die Zytokine TGF- β und IL-6 aus. Für das Verlassen der

Lymphknoten und die anschließende ZNS-Infiltration, benötigen die T-Zellen jedoch IL-23 (41, 42).

Für unsere Experimente verwendeten wir Tiere der CA-Mauslinie, die aus einer Kreuzung von IL-12p40^{-/-} und GF-IL-12-Mäusen gezüchtet wurden (82). Die Tiere der CA-Linie weisen daher eine Defizienz für die p40-Untereinheit von IL-12 bzw. IL-23 (p40^{-/-}) auf und exprimieren die Untereinheiten p35 und p40 unter transkriptioneller Kontrolle des GFAP- (Glial Fibrillary Acidic Protein) Promotors ausschließlich im ZNS. Somit kann die Synthese von IL-12 und eventuell auch IL-23 bei der CA-Tierlinie nur im ZNS erfolgen. Dadurch fällt die Aktivierung der Th0-Zellen zu Th1- bzw. Th17-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen weg. Die periphere Induktion einer EAE ist dabei folglich nicht möglich.

Peripher induzierte versus ZNS induzierte EAE

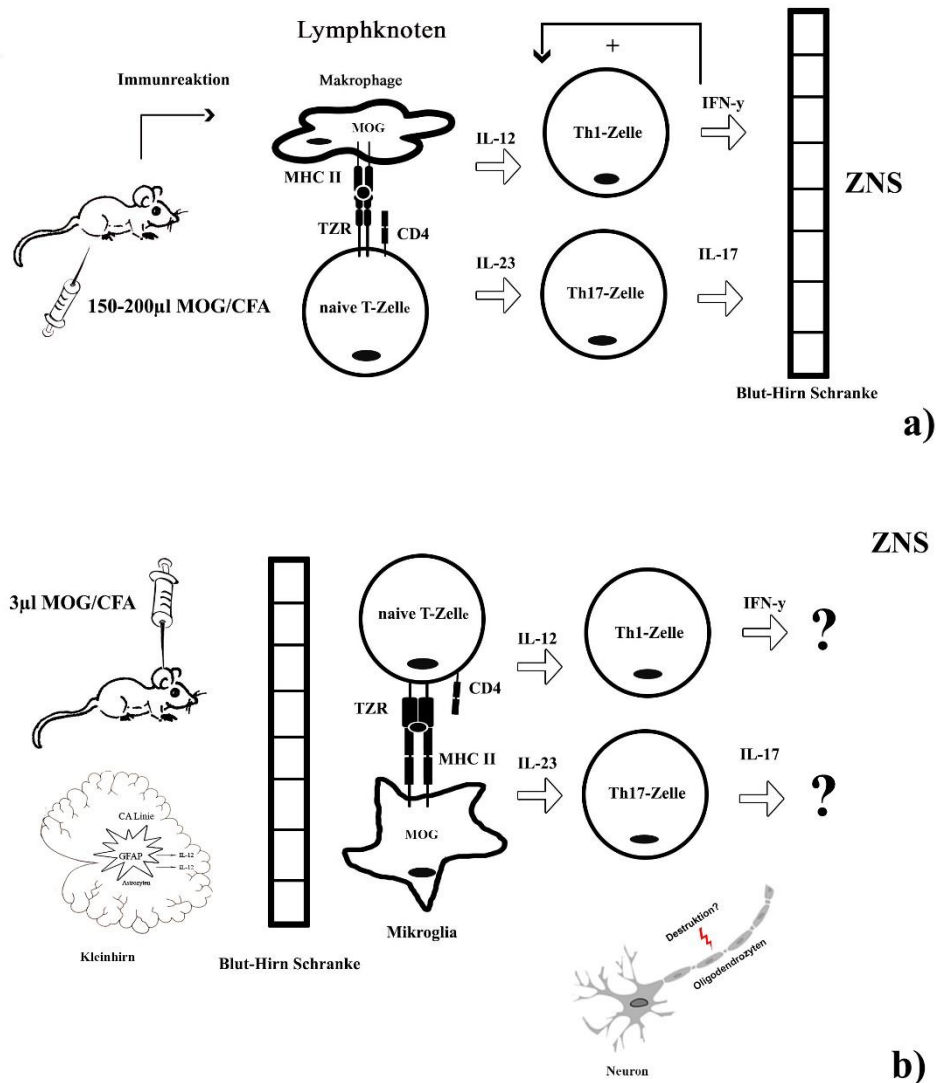


Abb. 1.2 Darstellung der peripher vs. ZNS-induzierter EAE.

a) bei der peripher induzierten EAE werden 150-200 µl Emulsion (MOG/CFA) subkutan in die Flanken der Versuchstiere injiziert. Im Lymphknoten oder der Milz erfolgt die Aktivierung von naiven CD4⁺T-Zellen. Unter der Einwirkung von IL-12 differenzieren die Zellen zu Th1-Zellen, unter IL-23 zu Th17-Zellen. Durch die vermehrte Zytokinausschüttung wird die BHS für die T-Zellen permeabel, welche in das ZNS eindringen und dort spezifisch MOG-haltige Zellen angreifen und so eine EAE auslösen.

b) bei der ZNS-induzierten EAE werden 3 µl Emulsion (MOG/CFA) in die rechte Kleinhirnhemisphäre der Versuchstiere der CA-Linie injiziert. Im Experiment soll herausgefunden werden, ob die T-Zellen wie bei der peripher induzierten EAE MOG-spezifisch aktiviert werden können. In dem vorliegenden Modell können IL-12 bzw. IL-23 nur in den transgenen Astrozyten exprimiert werden, weil alle anderen Zellen im Körper der Tiere defizient für p40 sind.

1.5 Ziele der Arbeit

Zusammenfassend hatte die Arbeit das Ziel, zu untersuchen, ob das ZNS unter bestimmten Umständen in der Lage ist, naive T-Zellen zu aktivieren. In unserem System hieß das, eine zerebrale Immunreaktion im ZNS anhand des EAE-Modells zu induzieren. Hierzu wurde MOG₃₅₋₅₅ in komplettem Freund-Adjuvans stereotaktisch in das Kleinhirnmarklager von Mäusen der CA-Linie injiziert. So wurde die ausgelöste Immunantwort auf die ZNS-Ebene begrenzt. Für die Arbeit ergaben sich daraus folgende Fragen:

- Inwieweit kommt es zu einer adaptiven T-Zell-Immunantwort?
- Gibt es MOG-spezifische T-Zellen, d.h. hat eine Antigenpräsentation im ZNS stattgefunden?
- Wie sehen die morphologischen und klinischen Befunde aus?
- Kann durch Verabreichung von Antikörpern gegen TGF- β die zerebrale Immunreaktion verstärkt werden?
- Wie werden die Zytokine IL-17 und IFN- γ reguliert?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Reagenzien, Chemikalien sowie Pufferlösungen wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Biozym (Hess. Oldendorf), Ambion (Austin, TX USA), Fisher Scientific (Nidderau), Promega (Mannheim), Riedel de Haën (Seelze) und Thermo Scientific (Karlsruhe) bezogen. Die gängigen Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Pipetten sowie sterile Einmal-Petrischalen wurden von den Firmen Greiner bio-one (Frickenhausen) und Eppendorf (Hamburg), die Objektträger und Deckgläser von Menzel-Gläser (Braunschweig) erworben.

2.2 Puffer und Lösungen

Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC)

Herstellung der Lösung nach Herstellerprotokoll

DAB Stocklösung

5 mg DAB (Merck, Darmstadt) in 1 ml TRIS (0,1 M pH = 7,2) gelöst. Filtration der Lösung.

DAB Färbelösung

50 µl DAB Stocklösung + 450 µl TRIS (0,1 M pH = 7,2) + 1 µl 30% H₂O₂

PBS (1x)

80 g NaCl (Merk, Darmstadt) + 11.5 g Na₂HPO₄ (Carl Roth, Karlsruhe) + 2.0 g KH₂PO₄ (Merk, Darmstadt) ad 10 l Aqua dest auf pH von 7,4

Proteinase K

Proteinase K 10 mg/ml (PeproLab, Erlangen) wurde 1:100 in Lyse-Puffer verdünnt.

SDS (sodium dodecyl sulfat, 10%)

10% SDS (Pharmacia Uppsala, Schweden) in Aqua bidest

25x TAE Puffer

1 Packung 25 X TAE Puffer (Ambion USA) Ad 1 l Aqua bidest

TE Puffer pH 8

10 ml Tris 1M (Acros Organics, Belgien) + 2 ml EDTA 0,5M (Serva, München) Ad 1 l Aqua bidest Auf pH 8 einstellen

TRIS Puffer

121,14 g TRIS-(hydroxymethyl)-methylamin (Acros Organics, Belgien) pH mit HCl einstellen Ad 1 Aqua bidest

Verdünnungslösung für Antikörper

25 ml PBS + 0,25 g BSA + 50 µl 5% NaN₃

2.3 Versuchstiere

Die im Experiment verwendeten Versuchstiere stammen aus vier Linien: CA, IL-12p40^{-/-}, MyD88^{-/-} und C57Bl/6. Die Hauptgruppe der operierten Tiere stammte aus der transgenen CA-Mauslinie. Die Tiere wurden in einem Alter zwischen 8-12 Wochen operiert und nach Beendigung der Experimente in einer tiefen Isofluran-Narkose dekapitiert. Präoperativ befanden sich diese in der specific pathogen free (SPF) Tierhaltung im BMFZ der Universität Marburg. Nach den erfolgten Operationen wurden die Tiere in die experimentelle Tierhaltung BMFZ der Universität Marburg in individually ventilated cages (IVC) versetzt und dort täglich der klinische Verlauf kontrolliert.

2.3.1 IL-12p40^{-/-}-Tierlinie

Die Versuchstiere der IL-12p40^{-/-}-Linie wurden auf einem C57Bl/6 Hintergrund gezüchtet und zeichneten sich durch die Disruption für die p40-Untereinheit aus (24). Die Tiere können also weder IL-12 noch IL-23 synthetisieren.

2.3.2 CA-Tierlinie

Die transgene CA-Mauslinie wurde speziell dazu gezüchtet, um die Rolle der Interleukine 12 und 23 im ZNS näher zu untersuchen.

Zunächst wurde die GF-IL-12-Linie auf einem C57Bl/6 Hintergrund gezüchtet. Bei dieser Linie werden die Untereinheiten p40 und p35 spezifisch in den Astrozyten unter transkriptioneller Kontrolle des GFAP-Promotors exprimiert (82). Anschließend wurden die Tiere dieser Linie mit IL-12p40^{-/-}-Tieren gekreuzt. Daraus ergab sich die CA-Linie, bei welcher IL-12 und IL-23 nur noch im ZNS in den Astrozyten synthetisiert wird.

2.3.3 MyD88^{-/-}-Tierlinie

Die MyD88^{-/-}- (Myeloider Differenzierungsfaktor 88) Mauslinie wurde freundlicherweise vom Immunologischen Institut der Universität Marburg (Prof. Bauer) zur Verfügung gestellt. Diese Linie ist defizient für MyD88, einem Adaptorprotein, das durch Interaktion mit der Toll-like-Rezeptor (TLR) -Familie eine entscheidende Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort, insbesondere bei Infektionen mit bakteriellen Zellbestandteilen wie Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykanen und Lipopeptiden, spielt. Die TLRs auf Oberflächen von dendritischen Zellen können z.B. LPS binden und über die Signalkaskade

IRAK zur u.a. Produktion von IL-12 führen. Bei Fehlen von MyD88 sind die Versuchstiere dementsprechend sehr anfällig für bakterielle Infektionen (13, 98).

2.4 Genotypisierung

Bei der CA-Tierlinie untersuchten wir sowohl die Transgenität für p40 und p35 (GF-IL-12) als auch die Disruption des IL-12p40 (p40^{-/-}). Dafür wurden die Tiere im Alter von etwa 3 Wochen am Ohr stanzenmarkiert, wodurch zum einen die Tiere gekennzeichnet und zum anderen Gewebe für eine DNA-Extraktion gewonnen wurde. Anschließend wurde aus den Stanzen DNA aufgereinigt und mittels PCR (Polymerase-Chain-Reaction) untersucht.

2.4.1 DNA-Isolierung

Verdau:

Abhängig von der Anzahl der Proben (Ohrstanzen) wurde ein Master-Mix für den Verdau aus Lysepuffer mit 1% Proteinase K angesetzt.

Lysepuffer (500 ml)			
Reagenz	Volumen [ml]	Endkonzentration	Hersteller
NaCl 5 M	20 ml	0,2 M	Merck, Darmstadt
+Tris 1 M(pH 8,35)	50 ml	0,1 M	Acros Organics
+EDTA0,5 M(pH 8,0)	5 ml	0,5 mM	Belgien Serva
+SDS 10%	10 ml	0,2 %	München Pharmacia
+Aqua bidest	Add 500 ml		Biotech, Freiburg

Die sich in 1,5 ml Reaktionsgefäßen befindenden Ohrstanzen wurden in 250 µl des Master Mix aufgenommen und über Nacht bei 56°C auf dem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) verdaut.

Mastermix/ Ohrstanze: 250 µl *Lysepuffer* + 2,5 µl *Proteinase K*

Aufreinigung:

Am nächsten Morgen wurden die Proben in den gleichen Reaktionsgefäßen auf 1 ml mit 100% EtOH aufgefüllt und auf einem Rüttler für 2-3 min kräftig geschüttelt und anschließend zentrifugiert (1400 U/min für 20-30 min bei Raumtemperatur). Daraufhin sah man ein deutliches Präzipitat. Nach dem Abpipetieren der wässrigen Phase wurden zum Präzipitat 250 µl TE (pH=7,4) hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben erneut für ca. 1 Stunde bei 42-46 °C auf den Thermomixer gestellt, um die DNA im TE-Puffer zu lösen.

2.4.2 PCR

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA in vitro. Um einen spezifischen DNA-Abschnitt zu amplifizieren benötigt man zwei Primer, die auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der Synthese festlegen. Dadurch wird das zu amplifizierende Fragment von beiden Seiten eingegrenzt. In der CA-Mauslinie wurden bei der PCR die Genabschnitte für die transgenen Bausteine des IL-12, IL-12p35 und IL-12p40, nachgewiesen. Das Polyadenylierungssignal von hGH (human Growth Factor) diente dabei als gegenläufiger Primer und sicherte gleichzeitig den Nachweis der transgenen Konstrukte p40 und p35, da die hGH-Sequenz im Wildtyp Mausgenom nicht vorkommt. Zudem wurden die Versuchstiere auf die Gendeletion von IL-12p40 getestet. Dafür mussten zwei unterschiedliche Master-Mix Ansätze zusammengestellt werden. Die PCR wurde dann jeweils in einem 25 µl Ansatz in einem Thermocycler durchgeführt.

Primer	Bindungsort an der DNA	Sequenz von 5' nach 3'
IL-12p35	5'	agcagtctctgaatcataa
IL-12p40	5'	acctaagttctttgttcgaa
hGH	3'	tgggcactggagtggcaactt

Tabelle 2.1 Primer zum Nachweis der transgenen Konstrukte. Mit Hilfe von 3 Primern wurden die Fragmente IL-12p40 und IL-12p35 nachgewiesen.

Reagenz	Volumen (µl)	Endkonzentration der Lösung	Hersteller
H ₂ O	18,32		
MgCl ₂	2,5	3,75 mM	Promega, Madison
PCR-Puffer 10x	2,5	1x	ABgene
dNTP's 10 mM	0,5	0,2 mM	PeqLab, Erlangen
5'Primer p40	0,25	0,44 ng/µl	Institut für Biologie III, Freiburg
5'Primer p35	0,08	0,17 ng/µl	Institut für Biologie III, Freiburg
3'Primer hGH	0,25	0,70 ng/µl	Institut für Biologie III, Freiburg
Taq-Polymerase	0,1	250 U	ABgene
DNA	0,5	-	-

Tabelle 2.2 Master Mix zum Nachweis transgener p40- und p35-Einheiten des IL-12.

Primer	Bindungsort an der DNA	Sequenz von 5' nach 3'
Neo 5'(forward)	5'	Ctcgtggccatattgggaac
Neo 3' (reverse)	3'	Tggccagcatctccaaact

Tabelle 2.3 Primer zum Nachweis der Neo-Kassette, die eine Disruption der IL-12p40 kodierenden Gensequenz (p40^{-/-}) anzeigt.

Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration der Lösung	Hersteller
H ₂ O	16,95		
MgCl ₂	2,5	25 mM	ABgene
Puffer	2,5	10x	ABgene
dNTP's	0,5	10 mM	PeqLab, Erlangen
Neo 3'	1	10 pmol/µl	Apara Bioscience GmbH, Denzlingen
Neo'5	1	10 pmol/µl	Apara Bioscience GmbH, Denzlingen
TAQ-Polymerase	0,1	250 U	ABgene

Tabelle 2.4 Master Mix zum Nachweis der Disruption der IL-12 p40 kodierenden Gensequenz.

2.4.3 Gelelektrophorese

1 x Natrium-Borat (SB)-Puffer	
50 ml 20x SB Stock Lösung Ad 1 l Aqua bidest	20x SB Stock (siehe Allgemeine Pufferlösungen)
6x Ladepuffer (100ml)	
12 ml 0,5 M EDTA + 70 ml 87% Glycerin + 90 µg Xylencyanol + 90 µg Bromphenolblau + 16 ml H ₂ O	Serva, München Carl Roth, Karlsruhe Sigma Aldrich, München Sigma Aldrich, München

Die amplifizierten DNA Fragmente wurden in einem Agarosegel nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurden 1,5 g des Agarosepulvers (Biozym, Hess. Oldendorf) in 100 ml 1x Natrium Borat Puffer gelöst. Diesen Ansatz kochten wir für ca. 1 min in einer Mikrowelle auf und ließen ihn kurz abkühlen. 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma Aldrich, München) wurden hinzugefügt und das Gel anschließend gegossen.

Nach Mischen der PCR-Proben mit jeweils 4 µl 6x Lade-Puffer, wurden diese in die Taschen des polymerisierten Gels pipettiert. Als Größenmarker diente ein 1 kb Ladder Mix (Fermentas,

St. Leon-Rot). Durch Anregung des Ethidiumbromids mit UV-Licht (Fisher Scientific, Nidderau) konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht und per Kamera aufgezeichnet werden. Bei den CA-Tieren wurde die Bande der transgenen Konstrukte in Höhe von 430 Basenpaaren (bp), bei der Testung auf Disruption von IL-12p40 auf Höhe von 385 bp, sichtbar (*siehe Abb. 2.1*).

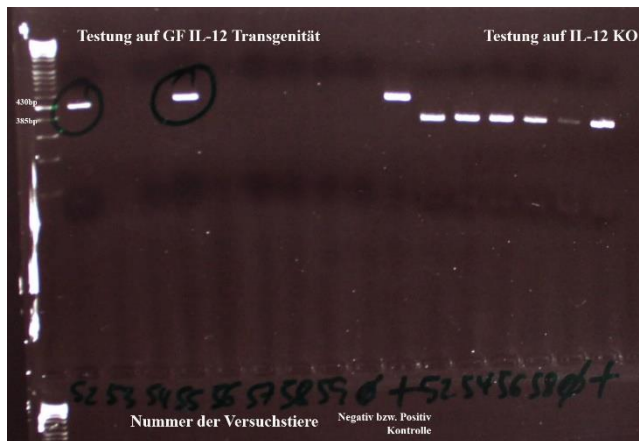


Abb. 2.1 Genotypisierung mittels PCR. Die transgenen Tiere der CA-Linie zeigten eine Amplifikation von 430 sowie 385 bp großer Fragmente.

2.5 Emulsion

Die Zusammensetzung der Emulsion wurde im Verlauf der Experimente etabliert. Dabei enthielt die zuerst verwendete *Emulsion 1* eine niedrigere MOG-Konzentration.

MOG₃₅₋₅₅	Sigma genosys
Sequenz	H-Met-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr-Arg-Ser-Pro-Phe-Ser-Arg- Val-Val-His-Leu-Tyr-Arg-Asn-Gly-Lys-OH
Molekulargewicht [Da]	2582.0

Emulsion 1:

- Abwiegen von 15 mg Mycobacterium tuberculosis (H37RA Difco, Detroit MI) Pulver
- Auflösen in 500 µl MOG-Lsg. (2 mg/ml, gelöst in PBS)
- Emulgation des Ansatzes mit 500 µl incomplete Freund-Adjuvans (IFA) (Difco, Detroit MI)

Emulsion 2:

- Abwiegen von 5,5 mg MOG₃₅₋₅₅ Pulver
- Auflösen in 150 µl Mycobacterium tuberculosis-Lsg. (10 mg/ml)
- Emulgation des Ansatzes mit 150 µl IFA analog *Emulsion 1*

Für die Negativ-Kontrollen wurden drei weitere Lösungen verwendet:

- IFA: 150 µl Freund-Adjuvans + 150 Aqua bidest
- CFA (complete Freund-Adjuvans): 150 µl Freund-Adjuvans + 150 µl Mycobacterium tuberculosis-Lsg. (10 mg/ml)
- Evans-Blue Farbstoff-Lsg.: 150 µl Freund-Adjuvans + 0,4 g Evans Blue ad 10 ml 0,9% NaCl unter Verwendung eines 0,45 µg Filters, verdünnt

Die Lösungen wurden in einer sterilen Werkbank in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurden die jeweiligen Lösungen mit zwei 500 µl Glasspritzen (Hamilton, CH-Bonaduz), welche durch einen Konnektor verbunden waren, durch rasches Pressen der Lösungen von einer Spritze in die andere unter hohen Scherkräften emulgiert. Die Stabilität der Emulsion wurde durch Zugabe eines Emulsionstropfens auf eine Wasseroberfläche getestet.

Der Emulgierungsprozess war vollständig, wenn die Emulsion als eine kugelige Masse im bzw. auf dem Wasser blieb und sich nicht auflöste.

Vor Gebrauch wurden die Spritzen mit 70%igem Alkohol desinfiziert, der Konnektor am Vortag autoklaviert. Beim Arbeiten wurden die Instrumente auf sterilen Petrischalen abgelegt. Die fertige, hochvisköse Emulsion wurde luftfrei in eine 10 µl Glasspritze (Hamilton, CH-Bonaduz) mit einer Kanüle von hinten befüllt und in die Stereotaxie-Einheit eingespannt.

2.6 Stereotaktische Operationen

Bei den Tieren der CA-Linie findet sich die höchste mRNA-Expression von IL-12 im Kleinhirn (82). Deshalb wählten wir die rechte Kleinhirnhemisphäre als Zielregion für die Injektion aus. Um eine präzise und reproduzierbare Injektion der Emulsion zu gewährleisten wurden die Tiere mit Hilfe einer stereotaktischen Vorrichtung operiert. Die Koordinaten zur intrazerebralen Injektion wurden von M.Vetter übernommen (107).

2.6.1 Operationsmaterialien

- Stereotaktische Einheit
- Operationsbesteck (Aesculap, Tuttlingen)
- Sterile Mulltupfer
- Narkoseeinheit (Isofluranverdampfer, Plexiglasbox, Belüftungs- und Abluftschlauch)
- Feiner Rosenbohrer (Aesculap, Tuttlingen)
- Sauerstoff (med.O2, Linde Gas Therapeutics, Deutschland)
- Glasspritze 10 µl mit Kanüle (Hamilton, CH-Bonaduz)
- Rasierapparat
- OP-Leuchte
- Filzstift zur Markierung
- Stoppuhr
- Sterile Petrischalen zum Ablegen von sterilem OP-Besteck
- Isofluran (Baxter, Unterschleißheim)
- EtOH 70% zur Desinfektion
- Steriles H₂O
- OP-Tücher
- Emulsion
- 0,9% NaCl zum Befeuchten der Augen (Braun®)



Abb. 2.2: Versuchsaufbau bei der Durchführung der stereotaktischen Operationen. Von links nach rechts: Plexiglasbox zur oberflächlichen Anästhesie des Versuchstieres sowie zuführender Anästhesie-Schlauch (Pfeil) zur Stereotaxie-Vorrichtung. MQ = autoklaviertes Wasser, 70% EtOH zur Desinfektion der OP-Instrumente und der Haut des Versuchstieres, Rasierer, große sterile Petrischale zum intraoperativen Ablegen der Instrumente und autoklaviertes OP-Besteck (roter Kasten).

2.6.2 Durchführung der stereotaktischen Operationen

Alle für die Operation benötigten Flächen wurden mit 70% igem Alkohol desinfiziert. Es folgte der Aufbau der OP- und Anästhesie-Vorrichtungen. Das Operationsbesteck wurde bereits am Vortag autoklaviert und während der Eingriffe auf einer großen sterilen Petrischale abgelegt, um Kontaminationen zu vermeiden. Zwischen den Eingriffen wurde das Besteck mit 70%igem Alkohol desinfiziert. An einem Operationstag konnten bis zu 10 Tiere operiert werden.

Nach Versetzen des Versuchstieres in eine oberflächliche Isofluran-Anästhesie in der dafür vorgesehenen Plexiglasbox (*siehe Abb. 2.3*), wurde es in die Stereotaxie-Vorrichtung fest eingespannt und am Operationsgebiet rasiert. Die Isofluran-Konzentration wurde so eingestellt, dass eine tiefe Narkose - erkennbar an einem Exophthalmus und niedriger Atemfrequenz mit hohem Atemzugvolumen - bestand.



Abb.2.3 Narkotisiertes Versuchstier in der Plexiglasbox vor dem Einspannen in die stereotaktische Vorrichtung.

Es folgte eine Desinfektion der rasierten Kopfhaut und des umgebenden Gewebes mit 70% igem Alkohol. Die Narkosetiefe wurde neben der Feststellung des Exophthalmus und des Atmungstyps durch festes Kneifen in eine Hinterpfote des Versuchstieres sichergestellt. Trat dabei keine Abwehrreaktion des Tieres auf, wurde die Operation durchgeführt. Die Haut am Kopf wurde mit einem Skalpell von kranial etwa 5 mm hinter den Augen bis zum kranio-kaudalen Übergang eröffnet. Die nun freiliegende Schädeldecke erlaubte eine gute Sicht auf die Schädelnähte, wobei der Schnittpunkt zwischen der Sagittal- und der Lambda-Naht (Lambda), aufgesucht wurde. Auf diesen Punkt wurde die Kanülenspitze der Hamilton-Spritze eingestellt. Nach Ablesen der ermittelten Koordinaten an der Stereotaxie-Einheit an der x- bzw. y-Achse, wurden diese protokolliert. Abschließend konnten die Zielkoordinaten (107) für die rechte Kleinhirnhemisphäre eingestellt werden:

x-Achse = - 1,0 mm rechts des Lambdas

y-Achse = - 2,5 mm caudal des Lambda

Nach Markierung des Injektionspunktes mit einem Filzstift auf der Schädelkalotte wurde der Knochen mit einem feinen Rosenbohrer in Form einer flachen Wanne bzw. Kuhle abgetragen. Dabei wurde versucht das Trepanationsgebiet so klein wie möglich zu halten. Die Bohrtiefe betrug etwa 0,3-1,00 mm. Dabei wurde darauf geachtet die Dura mater während der Trepanation nicht zu eröffnen. Anschließend wurde die Dura mater erst durch die Injektionskanüle minimal eröffnet und so das Infektionsrisiko minimiert. Nach der Vorbereitung der Trepanation wurde die Hamilton-Spritze wieder in die vorherige Position gedreht und bis auf die Dura mater abgesenkt. Die z-Koordinate der Dura-Ebene konnte nun

abgelesen und protokolliert werden. Es folgte das vorsichtige Vorschieben der Kanüle entsprechend der Koordinaten in die Tiefe.

z-Achse = - 2,5 mm (+ 0,3 mm Tasche)

Dabei hat es sich als günstig erwiesen, eine Tasche von ca. 0,3 mm für die zu injizierende, sehr zähflüssige Emulsion zu schaffen.

5 min	Langsame Injektion in die Kleinhirnhemisphäre
10 min	Belassen der Kanüle im ZNS
5 min	Vorsichtiges Herausziehen der Kanüle

Tabelle 2.5 Zeitschema zur Injektion von 3 µl Emulsion nach Einstellen der Koordinaten. Eine zu schnelle Injektion oder schnelles Herausziehen der Kanüle hätte zum Ausfließen der Lösung aus dem Trepanationsloch geführt. Das Zeitschema wurde bei analogen Experimenten mit Injektion wässriger Lösungen von Vetter et al. ausgearbeitet.

Nach Entfernen der Kanüle folgten die Hautadaption und der Verschluss der Wunde mit 3-4 Klammern. Um ein Austrocknen der Kornea zu verhindern wurden während der Operation die Augen der Versuchstiere mit 0,9% NaCl-Lsg. befeuchtet.

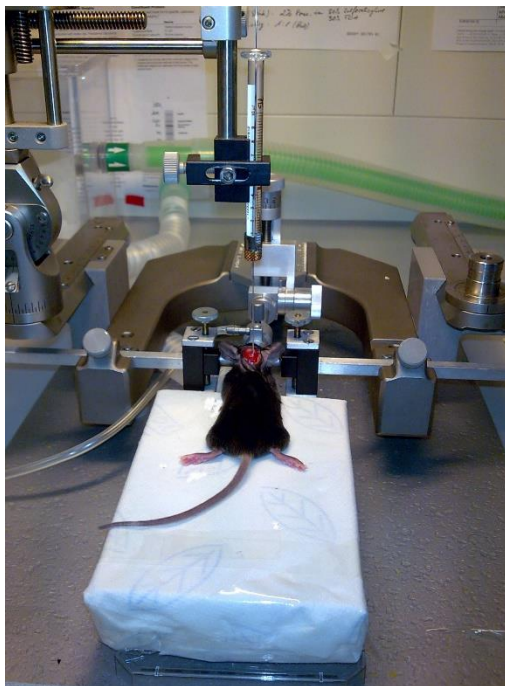


Abb. 2.4 In die Stereotaxie-Vorrichtung eingespanntes Tier. Die Haut im Operationsgebiet ist eröffnet, die Zielkoordinaten zur Injektion wurden ausgemessen und die Kanüle der Hamilton-Spritze zur Injektion in die rechte Kleinhirnhemisphäre eingeführt.

2.6.3 α -TGF- β

Bei einigen Operationsserien wurde vor der Injektion der Emulsion eine Lösung mit α -TGF- β (Klon von 1D11 R&D) verabreicht. Dies sollte die Differenzierung von Treg-Zellen durch TGF- β unterdrücken, um so eine Immunsuppression zu vermeiden. Die α -TGF- β -Lösung und die Emulsion wurden in zwei getrennten Glasspritzen (10 μ l) appliziert.

Prozedere:

1. Injektion der α -TGF- β -Lösung (3 μ l) analog des oben beschriebenen Vorgehens bei Emulsionsapplikation
2. Injektion der Emulsion

2.6.4 Pertussis Toxin

Das Pertussis Toxin findet seine Anwendung bei EAE, um die Immunantwort zu verstärken. Bei dem durchgeführten Experiment wurde das Ptx (Alexa) bei einigen Operationsserien den Versuchstieren durch eine intraperitoneale Injektion an Tag 0 und 2 postoperativ verabreicht:
5 μ l Ptx (100 ng/ml) + 145 μ l 0,9% NaCl/Tier.

2.6.5 CD4+2D2-Lymphozyten

Die CD4+2D2-Lymphozyten stammen aus der transgenen C57BL/6-Tg (Tcra2D2, Tcrb2D2) 1Kuch/J-Linie und zeichnen sich durch einen transgenen T-Zell-Rezeptor aus, welcher spezifisch MOG₃₅₋₅₅ erkennt. In der Studie von Betteli et al. konnte gezeigt werden, dass die Tiere ab dem 2.-3. Lebensmonat eine spontane Neuritis nervi optici entwickeln. In vier Prozent der Fälle (3 von 72 Mäusen) wurde zusätzlich eine spontane EAE dokumentiert (9).

Im Experiment wurden den Versuchstieren der CA-Linie 1×10^6 CD4+2D2-Lymphozyten am 2. postoperativen Tag intraperitoneal injiziert, um so das Auslösen einer Immunantwort zu unterstützen. Die verwendeten CD4+2D2-Lymphozyten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Huber, AG Lohoff, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Philipps Universität Marburg zur Verfügung gestellt.

2.7 Klinische Verlaufskontrollen

Nach der durchgeführten Operation wurden die Tiere am 1. postoperativen Tag in die experimentelle Tierhaltung gebracht und dort bis zu 42 Tage täglich auf die klinische Symptomatik untersucht und die Befunde protokolliert. Zur Beurteilung setzte man die Versuchstiere einzeln in einen Käfig, um die Symptome wie Laufen, Koordination und Gleichgewicht zu dokumentieren. Bei einer drastischen Verschlechterung des Allgemeinzustandes während des Beobachtungszeitraumes wurden die Versuchstiere zur Vermeidung starker Schmerzen getötet.

Score	Symptomatik
0	Keine Einschränkungen
0,5	Leichte Ataxie
1	Schwanzlähmung, Ataxie
2	Ataxie, Leichte Hinterpfotenlähmung
3	Komplette Hinterpfotenlähmung
4	Tetraparese
5	Moribund, Tod

Tabelle 2.6 EAE Score zur objektiven Beurteilung der Versuchstiere. Im Verlauf der klinischen Beobachtungsphase wurde der Score täglich protokolliert.

2.7.1 Operationsserien

Zur Etablierung der zerebral induzierten EAE wurden verschiedene Ansätze getestet. Dabei wurden das Volumen sowie die Zusammensetzung der Emulsion variiert und zusätzliche Injektionen von α -TGF- β , Ptx oder CD4+2D2-Lymphozyten gegeben. Insgesamt wurden sieben verschiedene Serien getestet.

Operationsserie 1:

Bei der ersten Serie wurden vier Tiere mit einem Emulsionsvolumen von 10 μ l operiert.

Tierlinie	Emulsion	MOG-Konzentration	Volumen (μ l)
CA (n=2)	MOG/CFA	2 mg/ml	10
IL-12p40 ^{-/-} (n=2)	MOG/CFA	2 mg/ml	10

Operationsserie 2:

Bei dieser Serie wurden insgesamt vier Tiere operiert, wobei eine Maus 7 µl Emulsion erhielt. Bei dieser Maus kam es intraoperativ zum Auslaufen der Emulsion aus dem Trepanationsloch, so dass bei den übrigen Tieren nur noch 5 µl appliziert wurden.

Tierlinie	Emulsion	MOG-Konzentration	Volumen (µl)
CA (n=1)	MOG/CFA	2 mg/ml	7
CA (n=3)	MOG/CFA	2 mg/ml	5
IL-12p40^{-/-} (n=2)	MOG/CFA	2 mg/ml	5

Operationsserie 3:

Das Volumen von 5 µl wurde zunächst weiter verabreicht. Zusätzlich erhielten die Tiere Ptx an Tag 0 und 2 der EAE.

Tierlinie	Emulsion	MOG-Konzentration	Volumen (µl)	Ptx erhalten
CA (n=7)	MOG/CFA	2 mg/ml	5	n=5
IL-12p40^{-/-} (n=3)	MOG/CFA	2 mg/ml	5	n=2

Operationsserie 4:

Bei der vierten Operationsserie wurden Tiere der Linien C57Bl/6 und CA operiert. In dieser Serie dienten die Tiere hauptsächlich der Negativkontrolle zu den vorangegangenen Serien, indem zum einen Lösungen ohne MOG injiziert und zum anderen Wildtyp Mäuse getestet wurden.

Tierlinie	Emulsion	MOG - Konzentration	Volumen (µl)
CA (n=2)	MOG/CFA	2 mg/ml	5
CA (n=4)	CFA	-	5
CA (n=8)	IFA	-	5
<i>Gesamt (Tiere)</i>	<i>n=14</i>		
C57Bl/6 (n=4)	MOG/CFA	2 mg/ml	5

Operationsserie 5:

Bei der fünften Operationsserie wurde das Injektionsvolumen der Emulsion nochmals auf 3 µl reduziert. Dabei wurden hauptsächlich die Tiere der CA-Linie operiert. Zur Negativkontrolle wurden sowohl Tiere der C57BL/6-, IL-12p40^{-/-}- und MyD88^{-/-}-Linie operiert als auch die Emulsion ohne MOG verabreicht.

Tierlinie	Emulsion	MOG - Konzentration	Volumen (µl)
CA (n=18)	MOG/CFA	2 mg/ml	3
CA (n=4)	CFA	-	3
<i>Gesamt (CA)</i>	<i>n=22</i>		
IL-12p40^{-/-} (n=10)	MOG/CFA	2 mg/ml	3
C57Bl/6 (n=10)	MOG/CFA	2 mg/ml	3
MyD88^{-/-} (n=3)	MOG/CFA	2 mg/ml	3
<i>Gesamt (alle Tiere)</i>	<i>n=45</i>		

Operationsserie 6:

Ab der Operationsserie 6 wurden ausschließlich Tiere der CA-Linie operiert. Die Konzentration von MOG wurde dabei auf 37 mg/ml deutlich erhöht (*siehe Herstellung Emulsion 2*).

Tierlinie	Emulsion	MOG - Konzentration	Volumen (µl)
CA (n=10)	MOG/CFA	37 mg/ml	3

Operationsserie 7:

Die Tiere erhielten entweder eine MOG-haltige Emulsion oder zusätzlich eine α -TGF- β -Lösung. Allen Versuchstieren wurden entweder CD4+2D2-Lymphozyten oder Ptx verabreicht.

Tierlinie	Emulsion	MOG - Konzentration	Volumen (µl)	2D2 Lymphozyten erhalten
CA (n=4)	MOG/CFA	37 mg/ml	3	n=4
CA (n=8)	MOG/CFA + α - TGF- β Lsg.	37 mg/ml	3	n=8
CA (n=8)	CFA + α -TGF- β -Lsg.	-	3	n=8
<i>Gesamt (Tiere)</i>				<i>n=20</i>
CA (n=3)	CFA	-	3	Ptx erhalten n=3
CA (n=3)	MOG/CFA	37 mg/ml	3	n=3
CA (n=3)	MOG/CFA + α - TGF- β -Lsg.	37 mg/ml	3	n=3
<i>Gesamt (Tiere)</i>				<i>n=9</i>
<i>Gesamt (alle Tiere)</i>				<i>n=29</i>

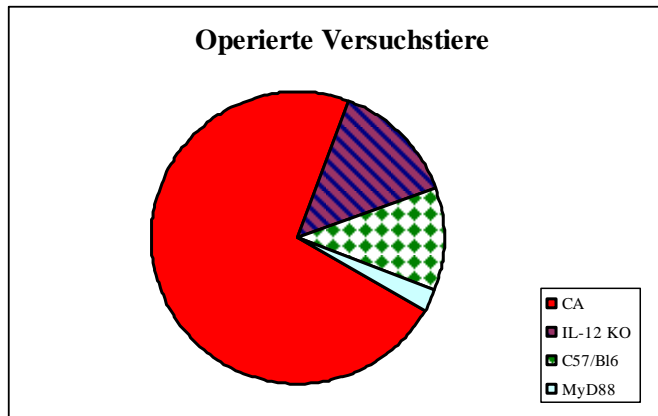


Abb. 2.5 Gesamtheit aller operierten Tiere. Insgesamt wurden 88 Tiere der CA-Linie, 17 Tiere der IL-12p40^{-/-}-Linie, 14 Tiere der C57Bl/6-Linie und 3 Tiere der MyD88^{-/-}-Linie stereotaktisch an der rechten Kleinhirnhemisphäre operiert.

2.8 Morphologie

Nach Vorbereitung der für die Gehirnentnahme und -fixierung benötigten Materialien, wurde das Versuchstier in eine tiefe Isofluran-Narkose versetzt und dekapitiert. Anschließend wurde die Kopfhaut von kaudal senkrecht eingeschnitten, so dass eine freie Sicht auf die Schädelkalotte ermöglicht wurde. Nun wurde der Schädelknochen vom Foramen magnum aus beidseitig lateral mit Hilfe einer feinen Knochenschere aufgeschnitten und die Kalotte vorsichtig vom Gehirn abgelöst. Es folgte die Mobilisation des Gehirnes sowie langsame Ablösung von der Schädelbasis, um anschließend das Gehirn mittels einer scharfen Rasierklinge sagittal zu teilen. Eine Hemisphäre wurde mit Hilfe von Tissue Tek (Sakura Finetek, NL) auf eine Korkplatte eingebettet und das Präparat in mit Stickstoff gekühltem Methylbutan (Merck, Darmstadt) zur späteren histologischen Aufarbeitung schockgefroren. Zusätzlich wurde bei einigen Tieren das Rückenmark entnommen. Dafür wurde die Wirbelsäule oberhalb der Darmbeinschaukeln durchtrennt, so dass an beiden Enden das Rückenmark sichtbar war. In das kaudale Ende des Spinalkanals wurde eine mit PBS oder NaCl gefüllte 5 ml Spritze angesetzt und die Flüssigkeit mit Druck in den Rückenmarkskanal injiziert. Durch den Druck wurde das Rückenmark aus dem kranialen Ende herausgepresst. Anschließend wurden die zweite Hirnhemisphäre sowie Teile des Rückenmarkes in Formalin fixiert bzw. in Flüssigstickstoff gekühltem Methylbutan schockgefroren. So wurde das Gewebe für spätere Kryostatschnitte oder RNA-Extraktionen aufbewahrt.

2.8.1 Histopathologische Untersuchung

Die schockgefrorenen Präparate wurden in einem Kryostaten (Leica, Wetzlar) bei einer Kammertemperatur von -17 °C in 5-10 µm dicke Sagittalschnitte verarbeitet. Durch die exemplarische Anfärbung der Emulsion mit dem Farbstoff Evans Blue war es möglich genau an der Einstichstelle dünne Schnitte sowohl für die Haemotoxylin-Eosin (HE)-Färbungen als auch für die Immunhistochemie anzufertigen. Bei den immunhistochemischen Untersuchungen wurden CD4+, CD8+ und CD45+ Lymphozyten sowie MAC1+ Makrophagen dargestellt.

2.8.1.1 Haematoxylin-Eosin Färbung

Hämalaun nach Mayer (1 l Ansatz)	
1 mg/ml Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
0,2 mg/ml NaJO ₃	Merck, Darmstadt
50 mg/ml KAl(SO ₄) ₂	Merck, Darmstadt
50 mg/ml C ₂ H ₃ Cl ₃ O ₂	Merck, Darmstadt
1 mg/ml C ₆ H ₈ O ₇	Merck, Darmstadt

Eosin-Färbelösung (100 ml Ansatz)	
1 g Eosin	Merck, Darmstadt
+ 50 ml Aqua bidest	Merck, Darmstadt
+ 50 ml 96% Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
+ 1 Tropfen 100 % CH ₃ COOH	Merck, Darmstadt

In der Haematoxylin-Eosin (HE) Färbung konnte die Morphologie der Gewebeschnitte beurteilt werden. Dabei färben sich die Zellkerne blauviolett, die übrigen Zellbestandteile wie z.B. Plasmazellproteine stellen sich in roten Abstufungen dar.

Nach Anfertigung der Kryostatschnitte wurden diese für 3 min mit Hämatoxylin gefärbt und anschließend 10 min unter lauwarmem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Schnitte in destilliertes Wasser überführt und mit Eosin für 2 min gegengefärbt. Es folgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkohol/ Xylol-Reihe (70%, 96%, 100% Ethanol und Xylol) über jeweils 2x 5min.

2.8.1.2 Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase Färbung

Die Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase (CAE) Färbung diente dazu, neutrophile myeloische Zellen und Gewebasmastzellen im Paraffinschnitt anzufärben. Diese stellen sich leuchtend rot dar. Die Färbung wurde angewendet, um eine eventuell stattgefundene Phagozytose von Bakterien darzustellen. Die Färbelösung wurde nach Protokoll frisch zusammengestellt.

Lösung I	Lösung II
1 Tropfen 4% Pararosanilin in 2 M HCl + 1 Tropfen 4% Natriumnitrit Nach 60 sec + 30 ml PBS-Puffer	10 mg Naphtol-ASD-Chloracetat in 1 ml Dimethylformamid lösen

Tabelle 2.7 Lösungen zur Herstellung der CAE-Färbung. Die beiden Lösungen wurden anschließend gemischt. Alle Reagenzien von Merck, Darmstadt.

Lösung I und II wurden unter kräftigem Rühren gemischt, wobei ein flockiger Niederschlag auftrat. Nach Filtrieren erschien die Lösung klar und rot.

Die Paraffinschnitte wurden aus A.dest. in Puffer gespült und für 30 min bei Zimmertemperatur in die Färbelösung gestellt. Anschließend erneutes Spülen mit A.dest. und Kernfärbung in Hämalalaun nach Meyer für 5 min. Als nächster Schritt wurden die Schnitte mit H₂O gebläut, getrocknet und mit Corbit eingedeckelt.

2.8.2 Immunhistochemie

In der IHC wurde das Gewebe auf die Infiltration von MAC1-, CD45-, CD4- und CD8-Zellen untersucht.

Durchführung:

Tag 1

- Fixieren der Kryostatschnitte auf Superfrost-Objektträgern bei -20 °C in MeOH/Aceton (1:1), (Riedel de Haën, Seelze) für 45 sec
- Kurzes Trocknen bei Raumtemperatur
- Schnitte 5 min in PBS Waschen
- Schnitte für 10 min in 0,3% H₂O₂ (100 ml PBS + 1 ml 30% H₂O₂) geben, dadurch Blockade der endogenen Peroxidase
- Schnitte kurz in PBS waschen
- Zugabe von Normal Serum (Goat-Serum) für 30 min
- Abschütten des Serums von den Schnitten
- Zugabe von 100 µl/Schnitt des 1. AK (CD4, CD8, CD45 R bzw. MAC I)
- Inkubation in einer feuchten Kammer im Kühlschrank über Nacht

Antikörper	Funktion	Verdünnung	Host	Klonalität	Herkunft
CD 4	Oberflächenantigen von T-Zellen (T-Helferzellen)	1:2000	Ratte	monoklonal	Pharmingen, USA
CD 8	Oberflächenantigen von T-Zellen (zytotoxisch)	1:2000	Ratte	monoklonal	Pharmingen, USA
CD 45R	Oberflächenantigen von B-Zellen	1:2000	Ratte	monoklonal	Pharmingen, USA
MAC I	Membrane attack complex, Makrophagen	1:500	Ratte	monoklonal	MPI Freiburg, Freiburg

Tabelle 2.8 Primärantikörper bei Immunhistochemie. Die 1.AK wurden am ersten Tag auf die Schnitte gegeben, welche über Nacht im Kühlschrank inkubierten.

Tag 2

- Abschütten des 1.AK, Waschen der Schnitte 3x für je 5 min in PBS
- Zugabe des 2. AK (Goat-anti-Rat) 1:200 verdünnt (0,1% BSA-Lösung = 0,5 g BSA ad 50 ml PBS), 100 µl/Schnitt
- Inkubation für 1 Stunde
- Kurzes Waschen der Schnitte in PBS
- Zugabe des ABC-Reagens (Vectastain Laboratories, USA) nach Protokoll auf die Schnitte sowie 1 Stunde Inkubation
- Abschütten des ABC-Reagens und kurzes Waschen in PBS
- Entwickeln der Schnitte mit DAB-Färbelösung, bei bräunlicher Färbung der Schnitte, Abstoppen mit PBS und kurzes Spülen mit destilliertem Wasser
- 15-30 sec HE-Färbung und 15 min Bläuung unter fließendem Wasser
- Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkohol/Xylolreihe (2 x 5 min 70%, 96%, 100% Ethanol, sowie 2 x 5 min Xylol)
- Eindecken mit Corbit -Balsam

2.9 Lymphozytenextraktion

Um zu untersuchen, ob die Lymphozyten nach der zerebralen Induktion MOG-spezifisch aktiviert wurden, wurden diese aus dem Kleinhirn extrahiert. Zur Beurteilung der Immunantwort im peripheren Lymphsystem wurden Milzlymphozyten der Versuchstiere entnommen.

Medium	Hersteller
<u>Verdauansatz 10 ml:</u> 0,1 g Collagenase + 9 ml PBS + 0,01 g DNase + 1 ml H ₂ O	Roche, Grenzach Roche, Grenzach
<u>FACS-Buffer:</u> 300 ml RPMI 1640 + 30 ml FBS (Fetales Bovines Serum) + 2 ½ ml Penicillin/Streptomycin	Gibco® Invitrogen, Karlsruhe PAA, Cölbe Invitrogen, Karlsruhe
<u>SIP (Stock Isotonic Percoll):</u> 11,1 ml 1,5 M NaCl (43,83 g NaCl + 500 ml MQ) + 100 ml Percoll	Sigma Aldrich, Buchs Schweiz
<u>Percoll Gradienten:</u> 30% = 45 ml SIP + 105 ml RPMI 80% = 80 ml SIP + 20 ml RPMI	

Durchführung:

- Zerkleinerung des herauspräparierten Kleinhirns in 9 ml kaltem PBS mit einem sterilen Skalpell in einer sterilen Petrischale
- Ansaugen der entstandenen Gewebsfragmente mit Hilfe einer Pipette und Überführen auf ein metallisches Sieb, das sich auf einer frischen sterilen Petrischale befindet. Streichen des Gewebes mittels eines Stempels durch das Sieb
- Erneutes Ansaugen des zerkleinerten Gewebes mit einer Pipette und Überführen in ein 50 ml Kunststoffröhrchen. Zugabe von 1 ml des Verdauansatzes (*siehe oben*)
- Inkubation des Ansatzes bei 37 °C für eine Stunde im Wasserbad

- Streichen des verdauten Gewebes durch ein steriles 40 µm Kunststoffsieb (BD, Biosciences) in ein frisches 50 ml Kunststoffröhrchen
- Zugabe von 10 ml FACS-Buffer
- Zentrifugieren bei 289 g für 10 min, Absaugen des Überstandes
- Zugabe von 20 ml FACS-Buffer auf das Zellpellet, Aufschütteln der Zellen und erneutes Zentrifugieren bei 289 g für 10 min
- Absaugen des Überstandes
- Zugabe von 7 ml 30% Percoll auf das Zellpellet und Vermischen der Bestandteile durch mehrmaliges Pipettieren
- Pipettieren von 2 ml 80% Percoll unter den Ansatz
- Zentrifugieren der Lösung für 25 min bei 680 g ohne Bremse

Nach dem letzten Schritt des Protokolls bildeten sich 4 sichtbare Phasen (*siehe Abb. 2.6*): die oberste Schicht aus Proteinen, 30%ige Percoll Phase (pink gefärbt), die trübe Interphase und eine farblose 80%ige untere Percoll Phase. Die Lymphozyten befanden sich dabei in der Interphase, welche vorsichtig mit Hilfe einer Pipette abgesaugt wurden. Zur Erleichterung können die oberen Schichten schon vorher abpipettiert werden. Die extrahierten Lymphozyten wurden anschließend in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer unter dem Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar) ausgezählt oder direkt einer FACS-Analyse unterzogen.

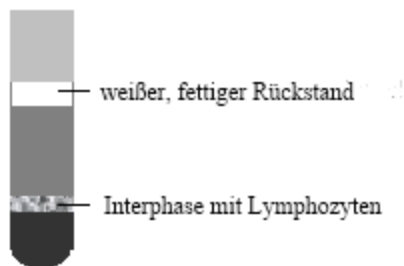


Abb. 2.6 Kunststoffröhrchen nach Lymphozytenextraktion. Nach letztem Schritt der Zentrifugation wurden 4 Phasen sichtbar (von unten nach oben): 80%ige Percoll-Schicht (schwarz), Interphase mit extrahierten Lymphozyten, 30%ige Percoll-Schicht (dunkelgrau) und oberste Phase aus weißem fettigen Rückstand

2.10 Durchflusszytometrie

Die FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)-Methode dient zur Analyse von Zellen, die mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern beladen sind. Bei der Passage durch eine Kapillare werden die Zellen an einem Laserstrahl vorbeigeführt und emittieren dadurch Fluoreszenzsignale, welche durch einen Detektor ausgewertet werden können. Dadurch können Aussagen über die in der Probe enthaltenen Zellpopulationen getroffen werden.

Im Experiment stammen die T-Zellen aus dem Kleinhirn der Versuchstiere nach stereotaktischer zerebellärer Injektion der Emulsion und wurden vor der Analyse spezifisch mit MOG₃₅₋₅₅ stimuliert, um anschließend deren Produktion von Zytokinen zu messen.

Eine erhöhte Produktion von IFN- γ wurde als Zeichen für eine Aktivierung der spezifischen Th1-Zellen und von IL-17 als Zeichen für eine Aktivierung von Th17-Zellen gewertet. Die T-Zellen konnten nur dann mit einer erhöhten bei EAE bekannten, Zytokinausschüttung reagieren, wenn sie zuvor im ZNS MOG-spezifisch aktiviert wurden.

Die FACS-Analysen wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Huber, AG Lohoff, im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Philipps Universität Marburg durchgeführt.

2.10.1 Oberflächenfärbung

Die aus dem Kleinhirn extrahierten T-Zellen wurden entweder unspezifisch mit PMA 5 ng/ml und Ionomycin 1 μ g/ml für vier Stunden oder alternativ spezifisch mit MOG-Peptid 100 μ g/ml für 6 bzw. 18 Stunden restimuliert. Beiden Ansätzen wurde Brefeldin A in einer Konzentration von 1 μ g/ml zugesetzt. Brefeldin A ist ein Produkt des Pilzes *Eupenicillium brefeldianum* und führt zur Akkumulation von Proteinen, wie beispielsweise Interleukinen, im Endoplasmatischen Retikulum (53).

Anschließend wurden die Zellen mit 1% FCS (Fetal Calf Serum) (Biowest, Nuaille, Frankreich) in PBS aufgenommen und einmal gewaschen (1500 rpm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in der Restflüssigkeit resuspendiert. Zur Oberflächenmarkierung der T-Zellen wurden pro Ansatz 1 μ l einer 1:10 Verdünnung des CD4-APC-Antikörpers zugegeben und die Ansätze auf Eis im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert. Zum Abschluss wurden die Zellen mit 1% FCS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

2.10.2 Formaldehydfixierung und Intrazelluläre Färbung

Zur Markierung der intrazellulären Antigene wurden die mit MOG stimulierten Zellen zunächst mit Formaldehyd fixiert. Die Fixierung führt zur Vernetzung der Proteine miteinander, wodurch die Strukturen der lebenden Zelle konserviert und erhalten werden. Bei der intrazellulären Färbung können Zytokine wie z.B. IL-17 mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern in fixierten T-Zellen detektiert werden.

Nach Waschen der Zellen in PBS, wurden diese in 1 ml einer 2%igen Formaldehydlösung aufgenommen. Der Fixierungsschritt erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Danach wurden die Zellen mit 1% FCS gewaschen, in 1 ml 1% FCS aufgenommen und bei 4° C gelagert.

Anschließend wurden zwischen 300-800 µl der fixierten Zellen in FACS-Röhrchen überführt und mit Saponin-Puffer (Sigma Aldrich, Taufkirchen) gewaschen. Saponin ist ein Detergens, das die Zellmembran permeabilisiert, so dass Antikörper in das Zellinnere eindringen können. Zugabe von 5-7 µl (Verdünnung 1:10) von IL-17 PE fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf die Zellen und Inkubation auf Eis für 30-45 min.

Anschließend Waschen der Zellen erst mit Saponin-Puffer, dann mit 1% FCS. Zum Abschluss wurden die Zellen in 300-800 µl 1% FCS aufgenommen und bis zur FACS-Messung auf Eis gelagert. Die Analyse der Zellen erfolgte mit dem FACS Calibur mit der CellQuest Pro Software (BD).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Mausmodells zur intrazerebral induzierten zerebralen Immunreaktion

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit das ZNS als immunkompetentes Organ fungieren kann, indem wir versuchten eine ausschließliche zerebrale Antigenpräsentation und Initialisierung der Immunantwort zu induzieren. Zur Etablierung eines solchen Verfahrens nutzten wir vorausgehende Arbeiten der Abteilung über stereotaktische Kleinhirn-Injektionen bei Mäusen sowie das Protokoll zur Induktion der peripheren EAE.

Bei den operierten Tieren handelte es sich hauptsächlich, um die transgene CA-Linie (n=88). Als Negativkontrolle wurden Tiere von drei anderen Linien operiert: IL-12p40^{-/-} (n=17), C57Bl/6 (n=14) und MyD88^{-/-} (n=3). Zur Verstärkung der Immunantwort applizierten wir bei einigen der Versuchsmäuse MOG-reaktive CD4+Lymphozyten aus Tieren der 2D2-Linie, Ptx oder α -TGF- β Lösung.

Die insgesamt 122 operierten Tiere der vier Linien lassen sich je nach appliziertem Volumen, Koordinaten, sowie zusätzlich verabreichten Lösungen, in sieben unterschiedliche Operationsserien einteilen. Die ersten fünf Operationsserien dienten zur Etablierung:

- der Koordinaten an der Stereotaxie-Einheit für die zerebrale Injektion der Emulsion
- der Herstellung und Zusammensetzung der Emulsion
- des Prozederes zur zusätzlichen intrazerebellären Injektion der α -TGF- β -Lösung.

3.1.1 Koordinaten für die ZNS Injektion

Als Injektionsstelle wählten wir das Kleinhirn, weil dort in den verwendeten Tieren der CA-Linie die höchste IL-12 Expression besteht (82). Das Operationsprotokoll und die Zielkoordinaten für eine Injektion in das Kleinhirn an der stereotaktischen Einheit wurden zunächst von M.Vetter übernommen. Es sind drei Koordinaten, welche eingestellt werden müssen: an der x-, y- und z-Achse für die Tiefe. Im Verlauf der Experimente mussten die Koordinaten für die z-Achse modifiziert werden, weil sich zeigte, dass es durch die zähe Konsistenz der Emulsion wiederholt zum Auslaufen der Lösung während der Injektion durch das Trepanationsloch kam. Daher wurde das Vorgehen dahingehend modifiziert, dass vor der Injektion eine Tasche von 0,3 mm Tiefe angelegt wurde, um Raum für das injizierte Volumen zu schaffen. Die etablierten Koordinaten lauten dabei wie folgt:

x-Achse = - 1,0 mm (rechts des Lambdas)

y-Achse = - 2,5 mm (rostral des Lambdas)

z-Achse = - 2,5 mm (+0,3mm Tasche)

Durch einmaliges Anfärben der Emulsion mit dem Farbstoff Evans Blue konnte die zielgenaue Injektion in die rechte Hemisphäre des Kleinhirns bestätigt werden. (siehe Abb. 3.1).

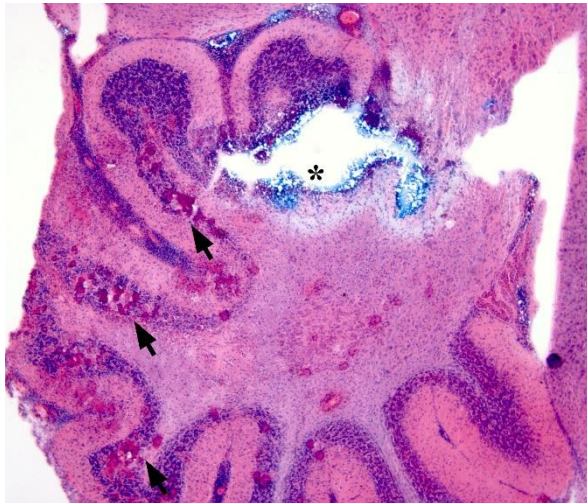


Abb. 3.1 HE-Färbung des Kleinhirns eines Versuchstieres der CA-Linie nach Induktion mit MOG (2 mg/ml)/CFA und Färbung der Lösung mit Evans Blue zur Lokalisation. Das Tier wurde nach einer Beobachtungszeit von 42 Tagen getötet. Die blau gefärbte Emulsion (*) befindet sich in der rechten Kleinhirnhemisphäre, es sind zudem die für die Mäuse der CA-Linie typischen Verkalkungen (Pfeile) und eine Auflockerung des Gewebes rund um die Emulsion zu erkennen. Vergrößerung: 1x5.

3.1.2 Herstellung und Zusammensetzung der Emulsion

Für die Induktion einer zerebralen EAE musste das sonst für eine periphere EAE-Induktion übliche Volumen (z.B. 100 µl Emulsion pro Injektionsort) deutlich reduziert werden. Bei der ersten Operationsserie (n=2 x CA, n=2 x IL-12p40^{-/-}) verabreichten wir wie in der Arbeit von M.Vetter ein Volumen von 10 µl, was jedoch zu deutlichen Hirndruck- bzw. Meningismuszeichen bei den Versuchstieren führte. Klinisch äußerten sich die Symptome in Form von gekrümmtem Rücken, abstehendem Fell im Nackenbereich sowie eingeschränkter Mobilität der Tiere. Bei der histopathologischen Auswertung wurde u.a. festgestellt, dass die injizierte Emulsion in das Ventrikelsystem drainierte und dort teilweise zum Verkleben der Abflusswege aus dem IV. Ventrikel führte. Durch die gestörte Liquorzirkulation entstand ein Hydrocephalus, der die oben beschriebene Symptomatik der Versuchstiere erklärte.

Deshalb wurde in weiteren Serien das Volumen schrittweise über 7 und 5 μ l auf schließlich 3 μ l reduziert. Um trotz des reduzierten Volumens eine signifikante Menge an Antigen applizieren zu können, wurde die MOG-Konzentration von 2 mg/ml auf 37 mg/ml erhöht.

Die Herstellung der Emulsion musste ebenfalls angepasst werden. Bei der peripher induzierten EAE werden insgesamt viel höhere Volumina verwendet, so dass die Lösungen in 2 ml Glasspritzen emulgiert werden. Da in dieser Arbeit insgesamt pro OP-Serie höchstens zehn Tiere operiert wurden, brauchten wir ein maximales Volumen von 30 μ l. Derart kleine Volumina in 2 ml Glasspritzen zu emulgieren, hätte zu einem hohen Verlust der Emulsion geführt. Um dieses zu vermeiden, wurde zunächst versucht, die Emulsion mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators herzustellen. Dabei bildete sich jedoch keine ausreichend feste Konsistenz der Emulsion, so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde. Das beste Ergebnis erzielten wir mit zwei kleineren Glasspritzen mit einem Fassungsvermögen von 500 μ l, welche durch einen Konnektor verbunden waren.

3.1.3 Prozedere zur intrazerebellären Injektion der α -TGF- β -Lösung

Die zerebrale Injektion der α -TGF- β -Lösung zusätzlich zur Emulsion wurde zunächst in der gleichen 10 μ l Glasspritze erprobt. Hierzu füllten wir die Spritze zuerst mit 3 μ l der α -TGF- β -Lösung und anschließend mit 3 μ l Emulsion auf. Die Injektion durch dieselbe Spritze erwies sich jedoch in der Praxis als schwierig, da durch die unterschiedliche Konsistenz der Lösungen die wässrige α -TGF- β -Lösung durch Druck der dichteren Emulsion zwangsläufig zu schnell injiziert wurde. Es erwies sich als praktikabel, die Lösungen in zwei verschiedenen Spritzen zu applizieren.

3.2 Ergebnisse der Operationsserien

Zur Etablierung des Systems testeten wir in den ersten Serien Tiere verschiedenen genetischen Hintergrundes, um die Ausprägung der klinischen Symptomatik nach stereotaktischer Injektion zu beurteilen. So war es beispielsweise notwendig, differenzieren zu können, ob die Ataxie als ein Symptom der zerebralen Immunreaktion durch MOG-Injektion entstand oder lediglich als Folge der Operation (Einstich und damit Gewebeverletzung durch die Kanüle bzw. verdrängende Wirkung der Emulsion) zu werten war. Dafür waren die Tiere der IL-12p40^{-/-}-Linie wichtig, da diese keine Ataxie als Antwort auf die MOG-Injektion entwickeln sollten. Bei den Tieren der CA-Linie erwarteten wir hingegen im Vergleich zu den Tieren der C57Bl/6-Linie eine deutlichere Ausprägung der klinischen Symptomatik, da diese Versuchsmäuse durch den genetischen Hintergrund eine erhöhte Interleukin-Produktion (IL-12 und IL-23) und folglich eine gesteigerte Entzündungsbereitschaft aufwiesen. Darüber hinaus wurden Emulsionen ohne MOG als Negativkontrollen getestet.

Bei den Serien 1-4 wurde das Volumen der zerebral injizierten Emulsion erprobt. Ab der Serie 5 wurde ein Volumen von 3 µl Emulsion eingesetzt. Nach durchgeführten FACS-Analysen in der fünften Serie, erhöhten wir die MOG-Konzentration ab der Serie 6 auf 37 mg/ml.

3.2.1 Serien 1-4

Bei der ersten Operationsserie zeigte sich, wie bereits oben (3.1.2) beschrieben, das injizierte Volumen als deutlich zu hoch, weshalb es bei der zweiten Operationsserie erst auf 7 µl (n=1 Tier der CA-Linie) und anschließend auf 5 µl reduziert wurde. Dabei schienen die beiden letzten Tiere dieses Volumen gut zu vertragen. Ein Auslaufen aus dem Trepanationsloch während der Operation war bei einem Volumen von 5 µl nicht zu beobachten.

Es wurden insgesamt 24 Tiere der CA-Linie, 3 Tiere der IL-12p40^{-/-}-Linie und 4 Tiere der C57Bl/6-Linie mit Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung injiziert (*siehe 2.7.1*). Dabei verstarben zwei Tiere der IL-12p40^{-/-}-Linie am 17. postoperativen Tag auf Grund einer zervikalen Raumforderung, die sich bei der histomorphologischer (HE-, CAE-Färbung) sowie makroskopischer Untersuchung als eine Granulom-artige Läsion herausstellte. Ein Tier der CA-Linie wurde ebenfalls aus der Wertung genommen, da bei diesem Tier eine zervikale Raumforderung mit eingeschränktem Allgemeinzustand bestand.

Als Negativkontrolle dienten Versuchstiere der IL-12p40^{-/-}- und C57Bl/6-Linie, welche mit einer MOG/CFA-Emulsion induziert wurden sowie Tiere der CA-Linie, welche eine CFA- oder IFA-haltige Emulsion ohne MOG erhielten. Einigen Versuchsmäusen der CA-Linie (n=5)

sowie der IL-12p40^{-/-}-Linie (n=2) wurde eine zusätzliche intraperitoneale Ptx-Injektion an Tag 0 und 2 verabreicht.

Die Tiere der CA-Linie zeigten kurz nach der Operation (1. bzw. 2. postoperativer Tag) eine milde Ataxie, welche im Verlauf schnell sistierte. Anschließend konnte bei den Tieren ein ataktisches Gangbild ab dem 13. postoperativen Tag beobachtet werden. Diese Ataxie war unabhängig von der injizierten Emulsion (MOG/CFA, CFA oder IFA) und der zusätzlichen Gabe von Ptx gleichermaßen zu beobachten.

Die Tiere der IL-12p40^{-/-}-Linie zeigten, bis auf die Ausprägung von zervikalen Granulom-artigen Läsionen im Bereich der tiefen Halslymphknoten (n=2), keine pathologische Symptomatik.

Die vier operierten Versuchstiere der C57Bl/6-Linie vertrugen die stereotaktische Induktion sehr schlecht. Bereits am 1. postoperativen Tag waren die Tiere in ihrer Bewegung stark verlangsamt und zeigten Meningismus-Zeichen in Form von gekrümmtem Rücken und Lichtempfindlichkeit. Deshalb wurden die Tiere am 1. bzw. 2. postoperativen Tag getötet und das Gehirn histomorphologisch untersucht. Dabei zeigte sich die bereits bekannte Problematik wie bei den Versuchstieren der ersten Operationsserie mit einer Induktion von 10 µl Volumen. Die Emulsion war zwar im Kleinhirn lokalisiert, drainierte jedoch auch in das Liquorsystem. Wie bereits oben beschrieben, ging es den meisten Tieren perioperativ gut, ein Auslaufen der Emulsion aus dem Trepanationsloch war nicht zu beobachten. Dennoch entschieden wir uns das Volumen der Emulsion weiter auf 3 µl/Versuchstier zu senken, um das Risiko eines Auslaufens in das Liquorsystem mit weiterer Drainage zu den Halslymphknoten zu minimieren.

3.2.2 Serie 5

Nachdem in den Operationsserien 1-4 der experimentelle Aufbau sowie das Volumen der Emulsion etabliert worden waren, wurden in der Serie 5 Versuchstiere von vier verschiedenen Tierlinien mit einem Emulsionsvolumen von 3 µl und einer MOG-Konzentration von 2 mg/ml operiert. Es wurden 22 Tiere der CA-Linie operiert, von denen 18 Versuchsmäuse eine MOG-haltige Emulsion und vier Tiere CFA als Negativkontrolle erhielten. Tiere der Linien IL-12p40^{-/-} (n=10) und C57Bl/6 (n=10) erhielten eine MOG-haltige Emulsion und dienten ebenfalls als Negativkontrollen.

Drei Tiere der MyD88^{-/-}-Linie erhielten ebenfalls eine MOG-haltige Emulsion. Diese Mäuse wurden eingesetzt, um herauszufinden, ob es eine bakterielle Kontamination während der Operationen gegeben hat, da in vorherigen Serien bei drei Tieren Granulom-artige Läsionen am Hals auftraten. Es war unklar, ob diese Läsionen als Immunreaktion auf das CFA auftraten oder

auf Grund von möglicher perioperativer Kontamination entstanden. Die Mäuse der MyD88^{-/-}-Linie sind insbesondere gegenüber bakteriellen Pathogenen sehr anfällig und entwickeln nach Kontakt mit infektiösen Keimen ausgeprägte klinische Symptome.

Die Versuchstiere wurden täglich beobachtet und zwischen dem 12. bis zum 42. postoperativen Tag getötet, um die Morphologie des ZNS zu untersuchen. Acht Tiere der CA-Linie (CFA: n=4, MOG/CFA: n=4) wurden bis zum 12. postoperativen Tag beobachtet, um an diesen Tieren anschließend eine Lymphozytenextraktion zur FACS-Analyse durchzuführen. Die FACS-Analyse war notwendig, da die klinisch beobachtete Ataxie nicht eindeutig als ein Effekt der MOG-haltigen Emulsion eingestuft werden konnte, da in vorangehenden Operationsserien auch Tiere, welche nur CFA oder IFA erhielten, ebenso Gangunsicherheiten aufwiesen. Dabei sollte untersucht werden inwieweit die T-Zellen MOG-spezifisch aktiviert wurden. Der 12. Tag wurde gewählt, weil zu diesem Zeitpunkt bereits klinische Symptome wie Ataxie bestanden und im üblichen EAE-Modell zu diesem Zeitpunkt erste Symptome auftreten. Während der klinischen Phase entwickelten die meisten Tiere der CA-Linie eine leichte bis schwere Ataxie sowie dezente Schwanzlähmungen. Einige der Tiere entwickelten eine linksseitige Lähmung, die sich im Verlauf besserte. Ein Versuchstier (CA-Linie, Induktion mit MOG/CFA) musste auf Grund von Meningismus-Zeichen, ausgeprägter Gewichtsabnahme sowie reduziertem Allgemeinzustand vorzeitig am 8. postoperativen Tag getötet werden. Ein zweites Tier (CA-Linie, Induktion mit MOG/CFA) entwickelte bereits am 1. postoperativen Tag eine zervikale Raumforderung, war jedoch im Allgemeinzustand nicht eingeschränkt. Dieses Tier wurde am 19. postoperativen Tag tot im Käfig aufgefunden. Die Raumforderung am Hals stellte sich in der histopathologischen Untersuchung als eine Granulom-artige Läsion heraus. Beide Tiere wurden aus der Wertung genommen.

Beim Vergleich der klinischen Symptomatik waren deutliche Unterschiede zwischen den Tierlinien erkennbar. Während die Tiere der MyD88^{-/-}- und IL-12p40^{-/-}-Linie keine Symptome entwickelten, sahen wir bei einigen Tieren der C57Bl/6-Linie eine dezente Ataxie, die sich innerhalb weniger Tage zurückbildete.

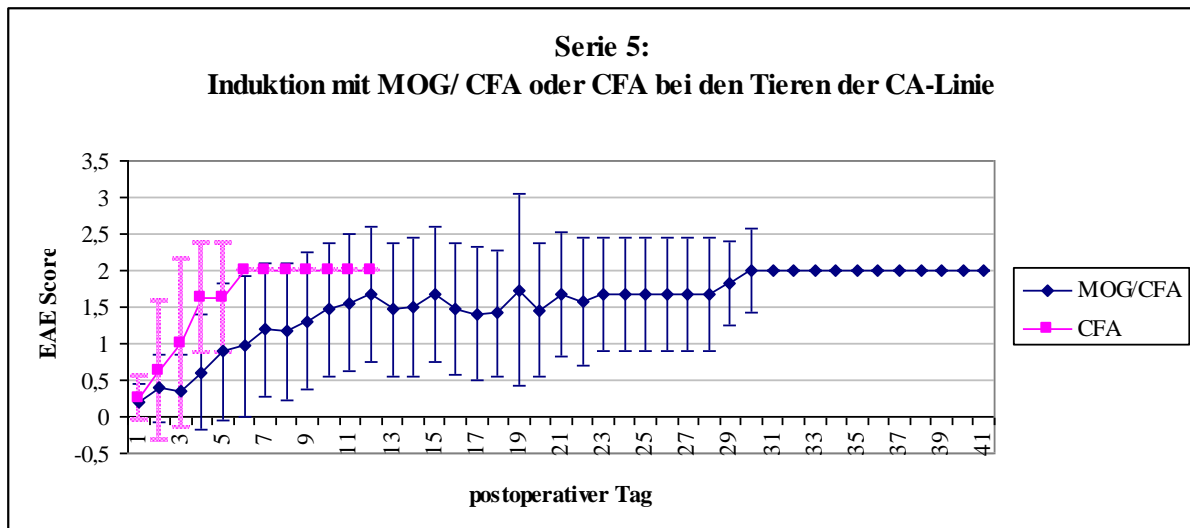


Abb. 3.2 Darstellung der Mittelwerte des EAE-Scores und der Standardabweichungen bei 20 Tieren der CA-Linie nach Induktion. Es wurden 2 verschiedene zusammengesetzte Emulsionen (3 μ l) appliziert (MOG/CFA und CFA). Acht Tiere der CFA- ($n=4$) und der MOG/CFA- Gruppe ($n=4$) wurden bis zum 12. postoperativen Tag beobachtet und anschließend getötet, um eine FACS-Analyse vorzunehmen. Die restlichen 12 Tiere der MOG/CFA-Gruppe wurden bis zum 41. Tag nach Induktion beobachtet. Bei allen Tieren ist ein steiler Anstieg des Scores bereits ab dem 2. Tag zu erkennen, der sich im Verlauf auf einen konstanten Score=2 einstellt.

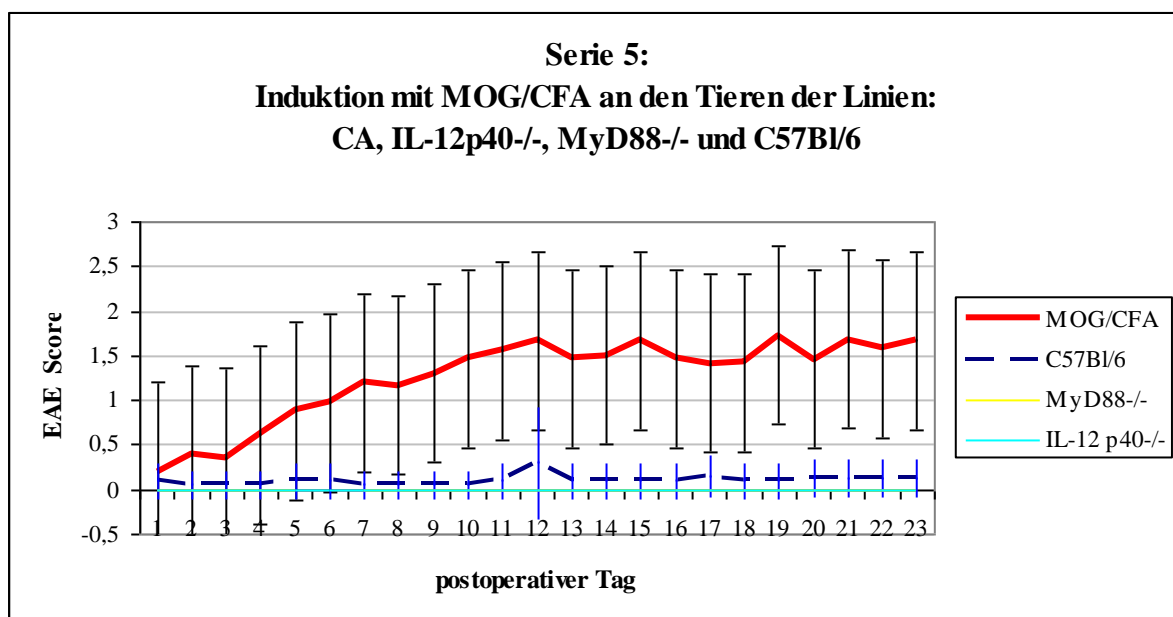


Abb. 3.3 Darstellung der Mittelwerte des EAE Scores und der Standardabweichung an 4 Tierlinien nach Induktion. Die Induktion bei allen Versuchstieren erfolgte mit MOG (2 mg/ml)/CFA (3 μ l). Die klinische Symptomatik der Tiere wurde bis zum 24. postoperativen Tag protokolliert. Die Tiere der CA-Linie ($n=12$) zeigten einen stetigen Anstieg des EAE Scores, welcher ab dem 13. postoperativen Tag auf einem nahezu konstanten Niveau von 1,6 bleibt. Die Tiere der C57Bl/6 Linie ($n=10$) entwickelten dagegen nahezu keine klinische Symptomatik, lediglich an Tag 12 erkennt man einen Peak von einem Score =0,4. Vier von zehn Tieren zeigten dabei eine Symptomatik. Die Tiere der Linien MyD88^{-/-} ($n=3$) sowie IL-12p40^{-/-} ($n=9$) zeigten über den gesamten Versuchszeitraum keine Symptome.

Postoperativ verzeichneten wir in einem Beobachtungsraum von 24 Tagen bei den Tieren der CA-Linie (n=12) eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 1,8 g (*siehe Tabelle 3.2 im Anhang*). Zwei vorzeitig verstorbene Versuchstiere wurden, wie oben erwähnt, aus der Wertung genommen. Dies waren die einzigen Tiere, die eine Gewichtsabnahme aufwiesen.

Im Verlauf der klinischen Beobachtungsphase nahmen bis auf zwei Versuchstiere der C57Bl/6-Linie alle Tiere an Gewicht zu. Durchschnittlich betrug die Gewichtszunahme bei den Tieren der IL-12p40^{-/-}-Linie insgesamt 2,5 g, wohingegen die Tiere der C57Bl/6-Linie ihr Gewicht mit einer Zunahme von 0,7 g beinahe konstant hielten. Die Tiere der MyD88^{-/-}-Linie, zeigten eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 1,7 g (*siehe Tabelle 3.3 im Anhang*).

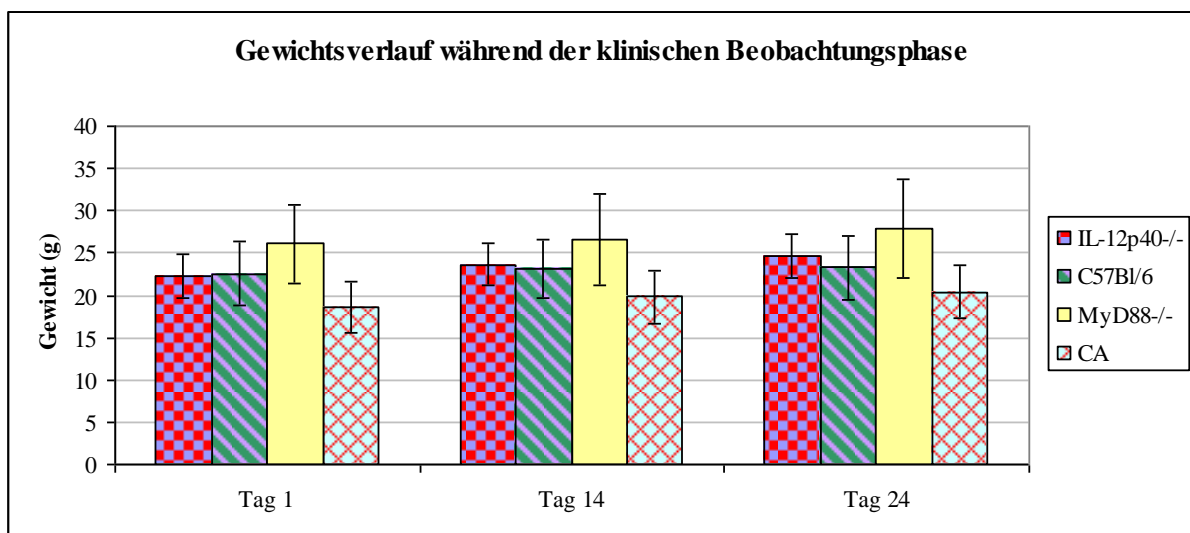


Abb. 3.4 Darstellung der Gewichtsmittelwerte und der Standardabweichungen der vier Tierlinien im Verlauf der klinischen Phase. Erkennbar ist eine Gewichtszunahme bei allen Tieren im Verlauf von 24 Tagen. Die Tiere wurden an 3 Zeitpunkten gewogen: Tag 1, 14 und 24. IL-12p40^{-/-} (n=10), C57Bl/6 (n=8), MyD88^{-/-} (n=3), CA (n=12)

In den FACS-Untersuchungen aus dieser Operationsserie wurden die aus dem ZNS extrahierten und danach in vitro stimulierten Lymphozyten aus den Tieren der CA-Linie (MOG/CFA: n=4, CFA: n=4) untersucht. Dabei wiesen 0,7% der T-Zellen aus der MOG/CFA-Gruppe eine MOG-Spezifität auf. Dies könnte auf die niedrige MOG-Konzentration zurückzuführen sein, weshalb die MOG-Konzentration in den darauffolgenden Experimenten erhöht wurde (*Emulsion 2, siehe Kap. 2.5.1*).

3.2.3 Serie 6

Ab dieser OP-Serie wurde die MOG-Konzentration auf Grund der FACS-Ergebnisse aus der OP-Serie 5 auf 37 mg/ml deutlich erhöht. Bei den ersten FACS Untersuchungen gab es wenig

spezifisch stimulierte T-Zellen, welche IFN- γ bzw. IL-12 synthetisierten. Die Überlegung war nun, dass die Menge an appliziertem MOG zu niedrig war, um eine Immunreaktion auszulösen. Es wurden nur Tiere der CA-Linie (n=10) in einem Beobachtungszeitraum von 12 Tagen untersucht.

Klinisch konnte bei den Versuchstieren eine Ataxie sowie eine dezente Schwanzlähmung beobachtet werden. Weitere Lähmungserscheinungen traten nicht auf.

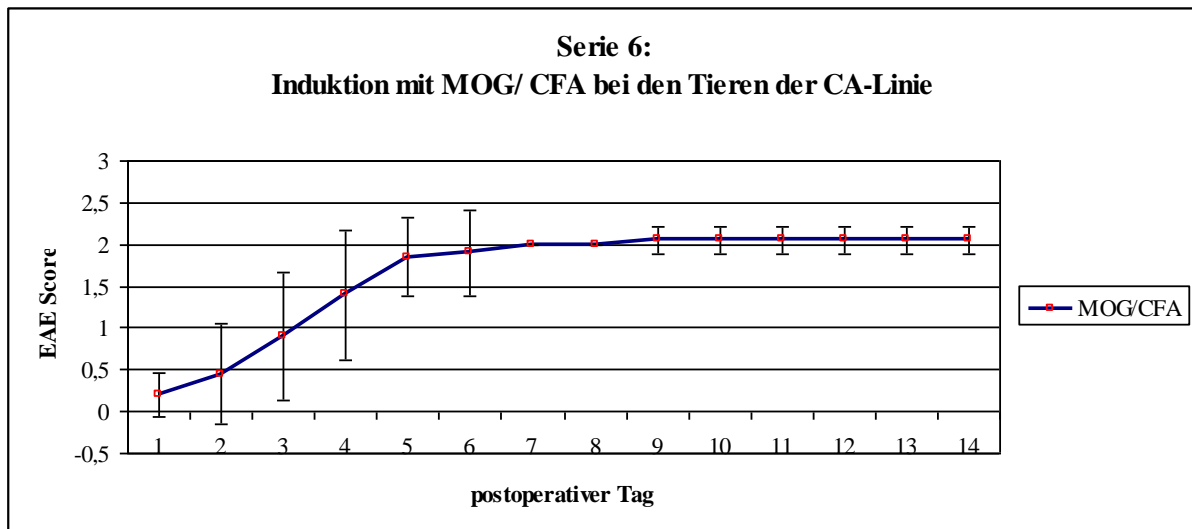


Abb. 3.6 Darstellung der Mittelwerte des EAE Scores und der Standardabweichungen bei der CA-Linie (n=10) nach Induktion mit MOG/CFA (37 mg/ml). Bei dieser Versuchsreihe erkennt man einen deutlichen Anstieg des EAE Scores, der sich im Verlauf auf einem konstanten Niveau (Score =2) hält.

3.2.4 Serie 7

In der siebten Serie wurden insgesamt 29 Tiere der CA-Linie operiert. 18 Tiere erhielten eine MOG-haltige Emulsion, 11 Tiere erhielten nur CFA als Negativkontrolle. Zusätzlich zu der Emulsion verabreichten wir den Tieren Ptx, α -TGF- β und/oder CD4+2D2-Lymphozyten.

MOG/CFA	Ptx	α -TGF- β	CD4+2D2-Lymphozyten	Gesamt (n=18)
+			+	4
+		+	+	8
+	+			3
+	+			3
CFA	Ptx	α -TGF- β	CD4+2D2-Lymphozyten	Gesamt (n=11)
+		+	+	8
+	+			3

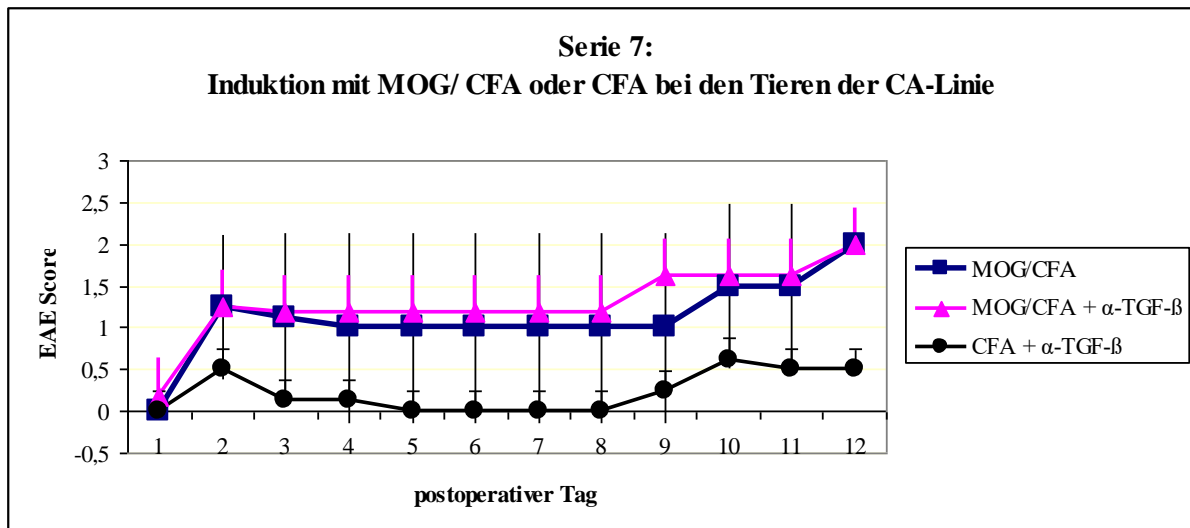


Abb. 3.7 Darstellung der Mittelwerte des EAE Scores und der Standardabweichungen bei den Tieren der CA-Linie (n=20) nach Induktion mit 3 unterschiedlichen Emulsionen und Applikation von CD4+2D2-Lymphozyten am 2. postoperativen Tag. Die Tiere wurden bis zum 12. postoperativen Tag beobachtet, anschließend erfolgte eine Lymphozytenextraktion sowie deren Auswertung mittels FACS-Analyse.

Bei den Versuchstieren, welche mit CD4+2D2-Lymphozyten behandelt wurden, sehen wir, dass die mit CFA/MOG + α -TGF- β und die mit MOG/CFA immunisierten Tiere nahezu gleichzeitig die ersten klinischen Symptome entwickeln, die im Laufe des Experimentes zunehmen. Der Mittelwert des EAE Scores bei der MOG/CFA + α -TGF- β Gruppe ist leicht, jedoch nicht signifikant erhöht. Im Gegensatz zu diesen Tieren entwickelten die Tiere, die nicht spezifisch und lediglich mit CFA + α -TGF- β injiziert worden waren, zunächst leichte Ataxie-Zeichen, welche sich anschließend zurückbilden und ab dem 10. postoperativen Tag auf einem etwas höherem konstanten Niveau anhalten.

Die Versuchstiere, welche eine intraperitoneale Ptx-Injektion erhielten, wurden am 7. postoperativen Tag getötet, um die frühe Entzündungsphase im ZNS beobachten zu können, weil wir davon ausgingen, dass die Inflammation nach längerer Beobachtungszeit abklingen kann. Zudem ist es in der Literatur beschrieben, dass die T-Zellen in den FACS Analysen mit längerer Beobachtungsdauer abnehmen (26, 74). Dabei wurde die Interleukinproduktion der T-Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. Die Tiere entwickelten bereits ab dem ersten Beobachtungstag eine deutliche Ataxie (Score 1-2) in allen 3 Gruppen (*siehe Abb. 3.8*). Dabei ist die klinische Symptomatik bei der MOG/CFA + α -TGF- β sowie der MOG/CFA Gruppe in etwa gleich stark ausgeprägt.

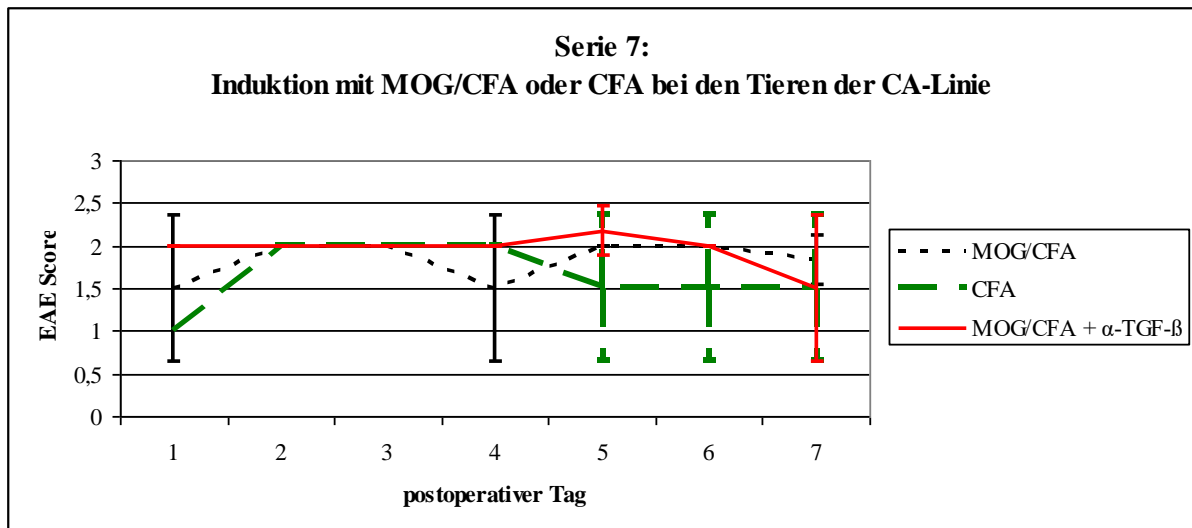


Abb. 3.8 Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichungen bei den Tieren der CA-Linie (n=9) nach Induktion mit 3 unterschiedlichen Emulsionen und i.p. Applikation von Ptx an Tag 0 und 2. MOG-Konzentration=37 mg/ml. Der EAE-Score bei der MOG/CFA und MOG/CFA + α -TGF- β Gruppe ist in etwa gleich mit leichter Erhöhung in der letzten Gruppe.

3.3 Morphologie

Zur Beurteilung der morphologischen Veränderungen am operierten Kleinhirn der Tiere wurden Untersuchungen mittels HE- und CAE-Färbungen durchgeführt. Darüber hinaus erfolgten immunhistochemische Untersuchungen zur Beurteilung der Lymphozyteninfiltration und damit einer Inflammation.

3.3.1 HE- und CAE-Färbungen

Die HE-Färbungen zeigten die korrekte Lokalisation der Emulsion in der rechten Kleinhirnhemisphäre. Bei den Tieren der CA-Linie ließen sich rund um die Emulsion Ansammlungen von Lymphozyten als Reaktion auf den Entzündungsreiz erkennen. Zudem waren Entzündungszeichen wie Auflockerung des Hirngewebes zu erkennen. Darüber hinaus zeigten sich Verkalkungen der Hirnstrukturen, welches ein typisches morphologisches Zeichen der CA-Linie ist. An der Injektionsstelle im Kleinhirn waren Einblutungen entlang des Einstichkanals zu erkennen. Im Gehirn von Tieren der Linien IL-12p40^{-/-}, C57Bl/6 und MyD88^{-/-} wurden keine Lymphozyteninfiltrate gesehen. Eine diskrete Auflockerung des Gewebes lag zwar vor, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei der CA-Linie.

In der CAE-Färbung wurde in keinem der Versuchstiere eine Infiltration durch neutrophile Granulozyten gesehen (*Abb. 3.11g*), die z.B. eine angeborene Immunreaktion anzeigen würden. Dieser Befund zeigte, dass die Entzündungszeichen nur auf die applizierte Emulsion und nicht auf eine bakterielle Kontamination zurückzuführen waren.

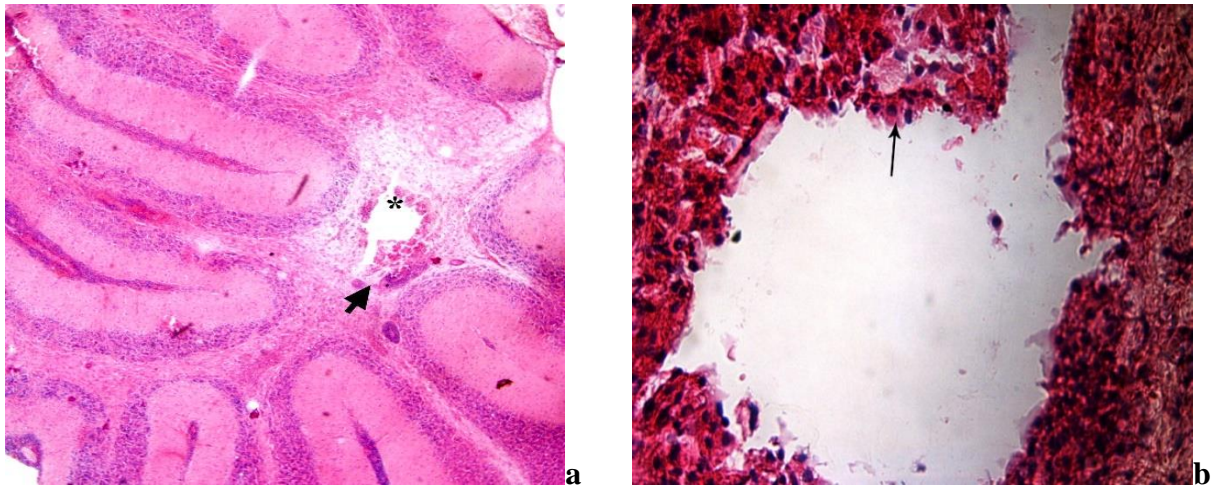


Abb. 3.9 HE-Färbung nach Induktion bei einem Tier der CA-Linie. Dieses Tier wurde mit MOG (2 mg/ml)/CFA induziert und bis zum 42. postoperativen Tag beobachtet.

a) Klinisch zeigten sich Symptome wie Ataxie. In der rechten Kleinhirnhemisphäre ist der Injektionsort der Emulsion (*) mit umgebender Gewebsauflockerung sowie Lymphozyteninfiltraten (Pfeil) erkennbar. Vergrößerung: 1x5. **b)** Dargestellt ist optisch leer der Injektionsort der Emulsion mit umgebenden Lymphozyten (Pfeil). Vergrößerung: 1x40.

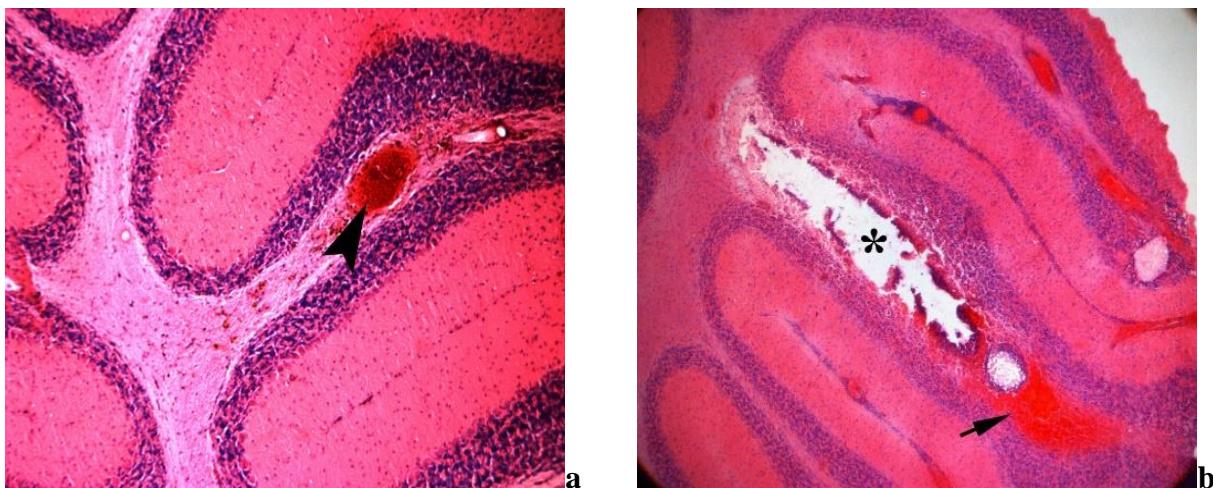


Abb. 3.10 HE-Färbung bei einem Tier der Linie IL-12p40^{-/-} nach Induktion mit MOG(2 mg/ml)/CFA. Das Tier wurde bis zum 28. postoperativen Tag beobachtet ohne Symptome einer EAE zu entwickeln. **a)** Dargestellt ist die rechte Kleinhirnhemisphäre mit Einblutung (Pfeil) nach Injektion. Vergrößerung: 1x5.

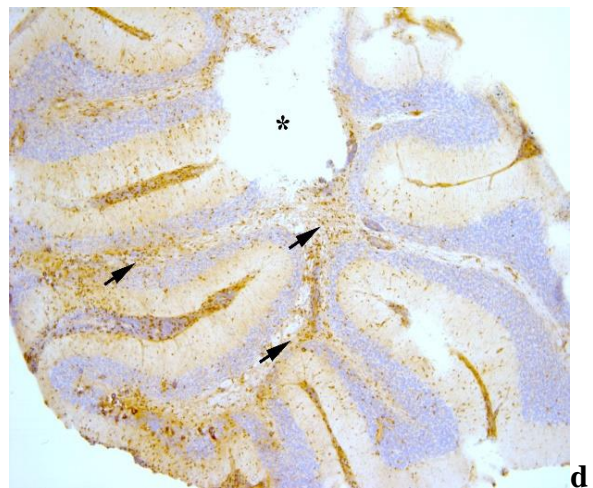
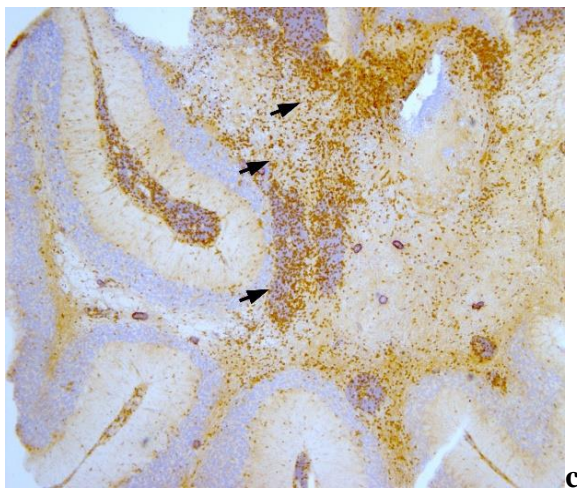
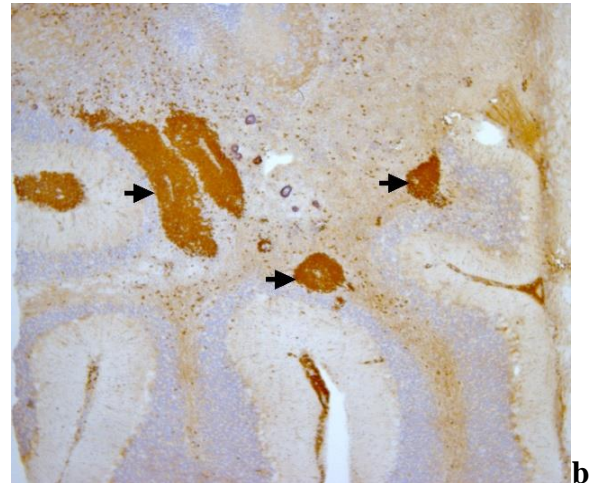
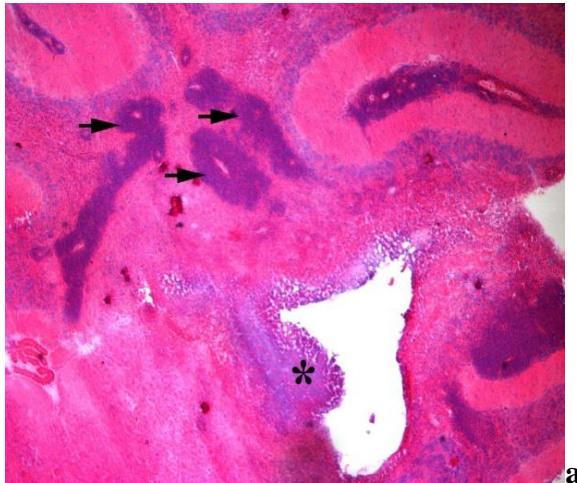
b) Dargestellt ist optisch leer der Injektionsort (*) sowie die Einblutung im Einstichkanal. Vergrößerung: 1x5.

3.3.2 Immunhistochemie

Zur Charakterisierung der lymphozytären Infiltration im ZNS wurden die Schnitte immunhistochemisch untersucht. Bei den Tieren der CA-Linie war eine diffuse Infiltration durch CD4⁺- sowie CD8⁺-Lymphozyten, v.a. im oberen Anteil der Kleinhirnhemisphäre, der Stelle der Injektion, zu erkennen (siehe Abb. 3.11 c-d). Weiterhin zeigten sich zahlreiche B-Lymphozyten, welche gehäuft um die Emulsionsstelle verteilt waren (siehe Abb. 3.11 b.). Die

MAC I positiven Zellen, bei denen es sich um Makrophagen handelt, konnten ebenfalls nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.11 e-f).

Bei einem Kontrolltier der CA-Linie ohne Induktion, zeigte sich keine Lymphozyteninfiltration im Kleinhirn. Es waren lediglich die für die Linie typischen Verkalkungsherde zu beobachten. (siehe Abb. 3.12)



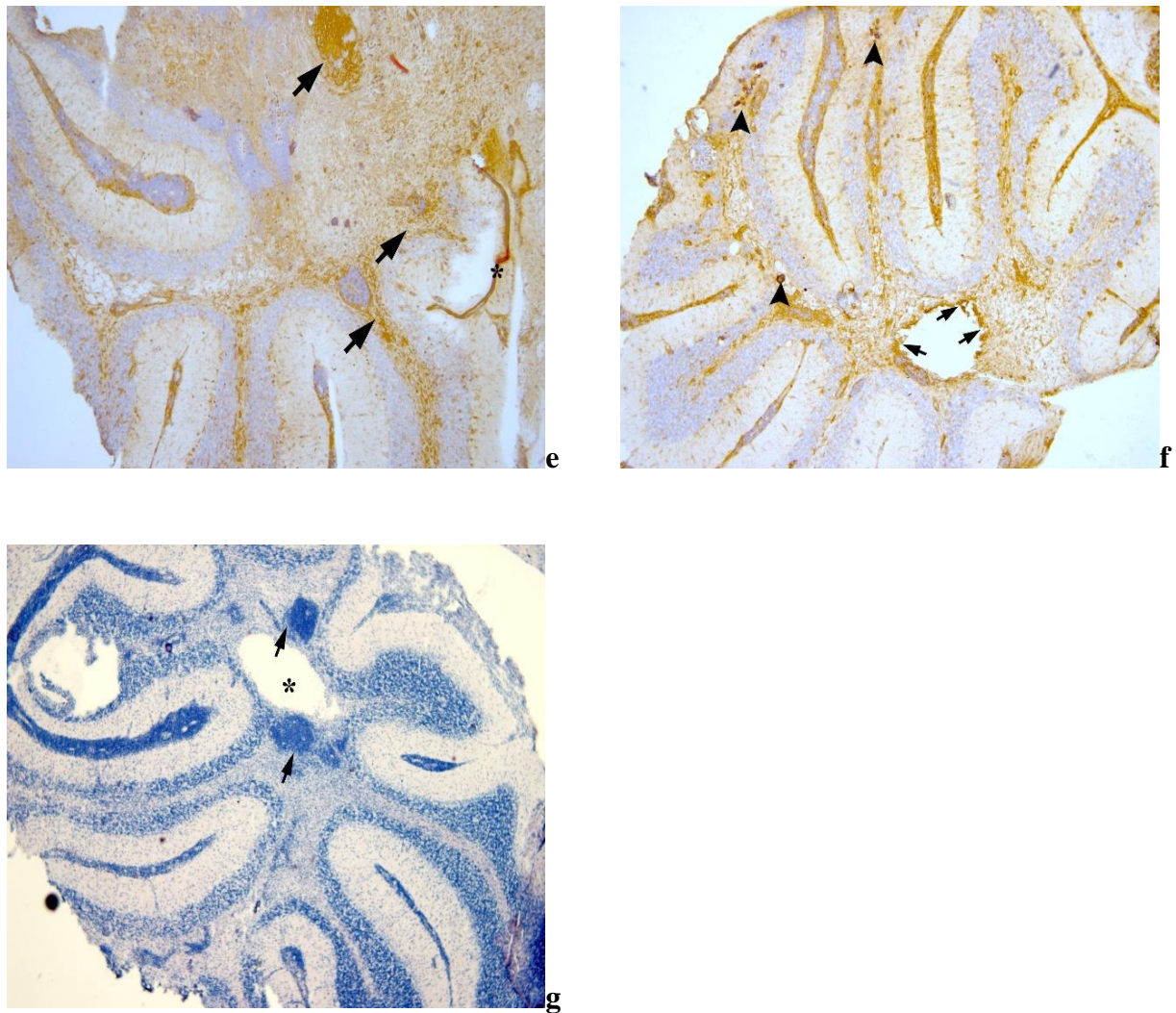


Abb. 3.11 Kleinhirn eines Tieres der CA-Linie nach Induktion und 42 tägiger Beobachtungsphase. Dem Tier wurde 2 mg/ml MOG mit CFA injiziert **a)** HE-Färbung mit Lymphozytenansammlungen (Pfeil). IV Ventrikel (*). Vergrößerung: 1x5 **b)** IHC auf CD45+ B-Lymphozyten (Pfeile). Diese färben sich bräunlich an. Vergrößerung: 1x5. **c)** IHC auf CD4+-T-Zellen. Im Kleinhirn verteilt befinden sich bräunlich gefärbte CD4+T-Zellen (Pfeile) als Reaktion auf die Emulsion. Vergrößerung: 1x5 **d)** IHC auf CD8+T-Zellen (Pfeile). Vergrößerung: 1x5. **e)** IHC auf MAC I positive Zellen (Makrophagen) (Pfeile). Vergrößerung: 1x5 **f)** Emulsion (*) mit umgebenden Makrophagen (dünne Pfeile), typische Verkalkungen (dicke Pfeile). Vergrößerung: 1x5 **g)** CAE-Färbung zur Darstellung neutrophiler Granulozyten als Zeichen einer innaten Immunreaktion. Diese würden sich leuchtend rot anfärben. Es konnte in keinem der Schnitte eine Infiltration mit neutrophilen Granulozyten gezeigt werden. Die injizierte Emulsion (*) mit umgebender Lymphozyteninfiltration (Pfeil). Vergrößerung: 1x5.

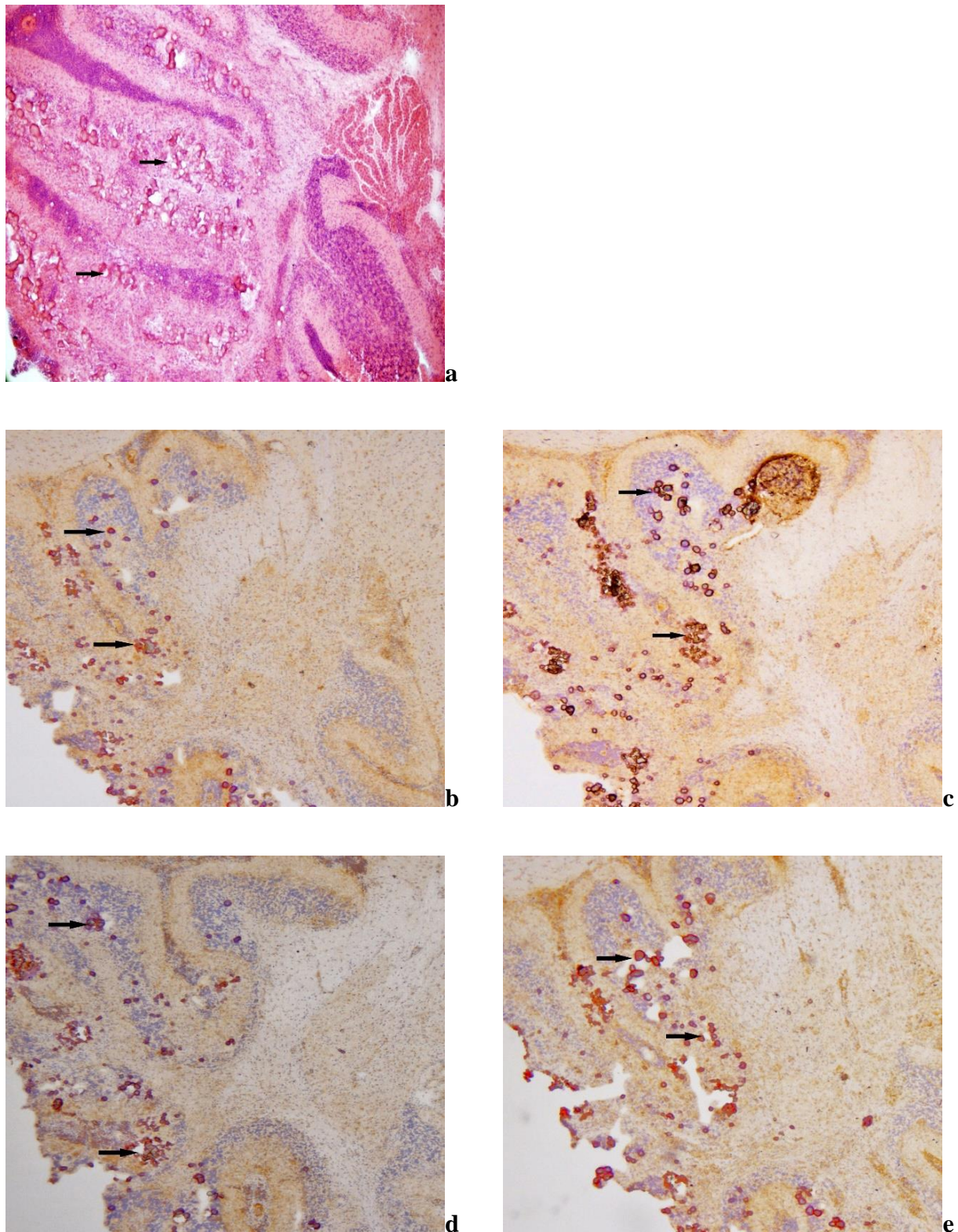


Abb. 3.12 Rechte Kleinhirnhemisphäre bei einem Tier der CA-Linie. Dieses Tier wurde nicht operiert und diente als Kontrolle zu induzierten Tieren. Es zeigen sich keine Lymphozytenansammlungen. Zu sehen sind die typischen Verkalkungsherde (Pfeile) im gesamten Kleinhirn des Tieres. **a)** HE-Färbung. Es lassen sich keine Lymphozytenansammlungen identifizieren. Vergrößerung: 1x5 **b)** IHC auf CD4+T-Zellen. Keine Anfärbung von T-Zellen, Verkalkungen (Pfeil). Vergrößerung: 1x5 **c)** IHC auf CD8+T-Zellen. Keine Anfärbung von T-Zellen, Verkalkungen (Pfeil). Vergrößerung: 1x5 **d)** IHC auf CD45+Zellen. Keine Anfärbung von B-Zellen, Verkalkungen (Pfeil). Vergrößerung: 1x5 **e)** IHC auf MAC 1 Zellen. Keine Anfärbung von Makrophagen, Verkalkungen (Pfeil). Vergrößerung: 1x5

3.4 FACS-Analyse

In den immunhistochemischen Untersuchungen konnten wir Lymphozyten im Kleinhirn der Versuchstiere nachweisen. Dabei konnten wir jedoch keine Aussage darüber treffen, ob diese Lymphozyten tatsächlich MOG-spezifisch aktiviert wurden und nicht als eine unspezifische Immunantwort auf Grund der zerebellären Injektion zu werten waren. Deshalb wurden bei den OP-Serien 6 und 7 (Induktion mit einer MOG-Konzentration von 37 mg/ml) die Lymphozyten *in vitro* untersucht. Die Versuchstiere der CA-Linie wurden nach zerebellärer MOG-Injektion an Tag 12 getötet. Es folgte eine Lymphozytenextraktion aus dem Kleinhirn. Die isolierten T-Zellen wurden anschließend spezifisch mit MOG₃₅₋₅₅ oder - als Positivkontrolle - unspezifisch mit PMA/Ionomycin stimuliert. Im anschließenden FACS werteten wir die Zytokinsynthese von IFN- γ sowie IL-17 in CD4+T-Zellen aus. Die Stimulierung der Zellen erfolgte im ersten Versuch über 5 Stunden und wurde in der zweiten Auswertung auf 18 Stunden verlängert.

3.4.1 FACS-Analysen nach 5 stündiger Stimulation

Bei der 5 stündigen Stimulation untersuchten wir Lymphozyten aus 10 Tieren der CA-Linie der Serie 7, die alle eine zusätzliche Injektion mit CD4+2D2-Lymphozyten erhielten. Die Versuchstiere lassen sich dabei bezüglich der verabreichten Emulsion in drei Gruppen einteilen:

1. MOG/CFA + α -TGF- β : n=4
2. MOG/CFA: n=2
3. CFA+ α -TGF- β : n=4

Bei der Gruppe 1 (MOG/CFA + α -TGF- β) produzierten 0,24% der CD4+T-Zellen IL-17. In der Gruppe 2 (MOG/CFA) und 3 (CFA+ α -TGF- β) waren es hingegen nur 0,12% bzw. 0,13% der Lymphozyten, die IL-17 synthetisierten. Für den deutlichen Unterschied zwischen Gruppe 1 und 2 könnte hierbei die Injektion von α -TGF- β ursächlich sein

Im Gegensatz zu IL-17 wird die IFN- γ Produktion durch Verabreichung von α -TGF- β unterdrückt. In der Gruppe 2 (MOG/CFA) synthetisieren 3,02% der T-Zellen IFN- γ . In der Gruppe 1 (MOG/CFA + α -TGF- β) produzierten 1,78% der T-Zellen IFN- γ und in der Gruppe 3 (CFA + α -TGF- β) 0,89%.

Bei der unspezifischen Stimulation der CD4+T-Zellen zeigten sich zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Es synthetisierten in der Gruppe 1 (MOG/CFA+ α -TGF- β) 17,8% der T-Zellen IFN- γ , in der Gruppe 2 (MOG/CFA) 19,98% und in der Gruppe 3 (CFA+ α -TGF- β) 18,00 %.

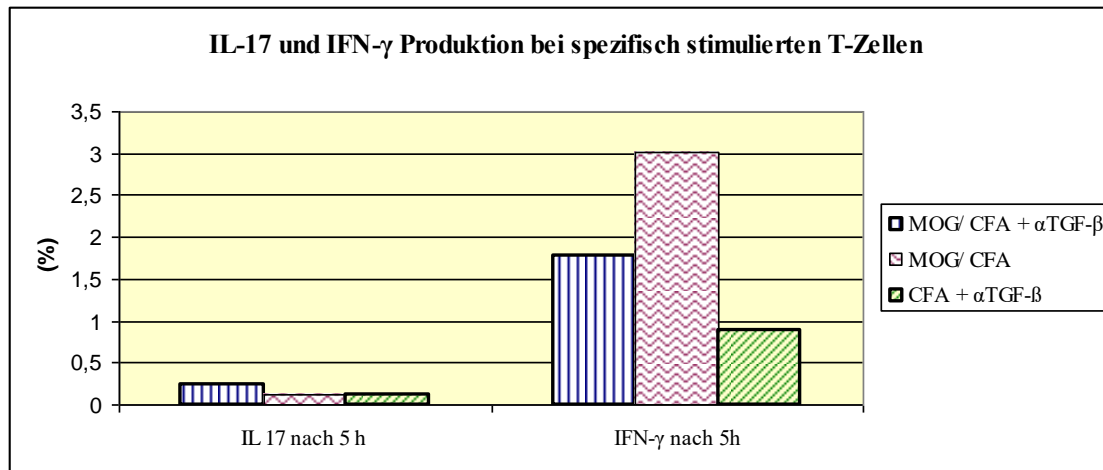


Abb. 3.13 Produktion von IL-17 und IFN- γ bei spezifisch stimulierten T-Zellen. Die Zellen wurden für 5 Stunden mit MOG₃₅₋₅₅ stimuliert und anschließend die Zytokine gemessen. Dabei zeigt sich die höchste Expression bei IFN- γ nach 5 Stunden in der MOG/CFA Gruppe

ZNS

Stimulation MOG₃₅₋₅₅ 5h

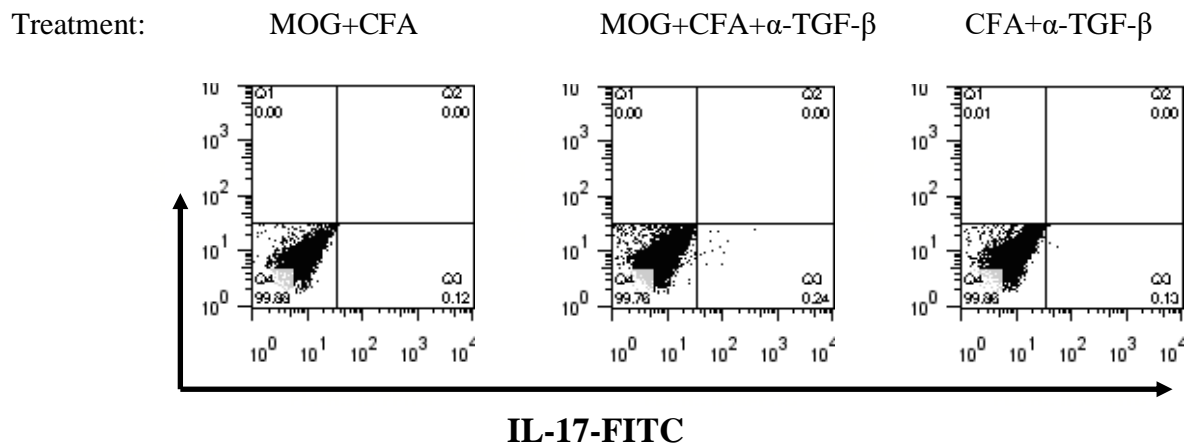


Abb. 3.14 Auswertung der FACS-Analyse nach stereotaktischer intrazerebellärer Induktion mit MOG bei den Tieren der CA-Linie. Auf der Ordinate sind CD4+T-Zellen, auf der Abszisse IL-17 dargestellt. Die Versuchstiere wurden mit 3 unterschiedlich zusammengesetzten Emulsionen bei einer MOG-Konzentration von 37 mg/ml sowie CD4+2D2-Lymphozyten induziert. Nach Beenden der klinischen Beobachtungsphase von 12 Tagen, erfolgte eine Lymphozytenextraktion aus dem ZNS zur Analyse mit dem FACS-Gerät. Dargestellt ist die IL-17 Produktion nach 5 stündiger spezifischer Stimulation mit MOG₃₅₋₅₅. Dabei zeigt sich die höchste Expression von IL-17 in der MOG/CFA + α -TGF- β Gruppe mit 0,24%.

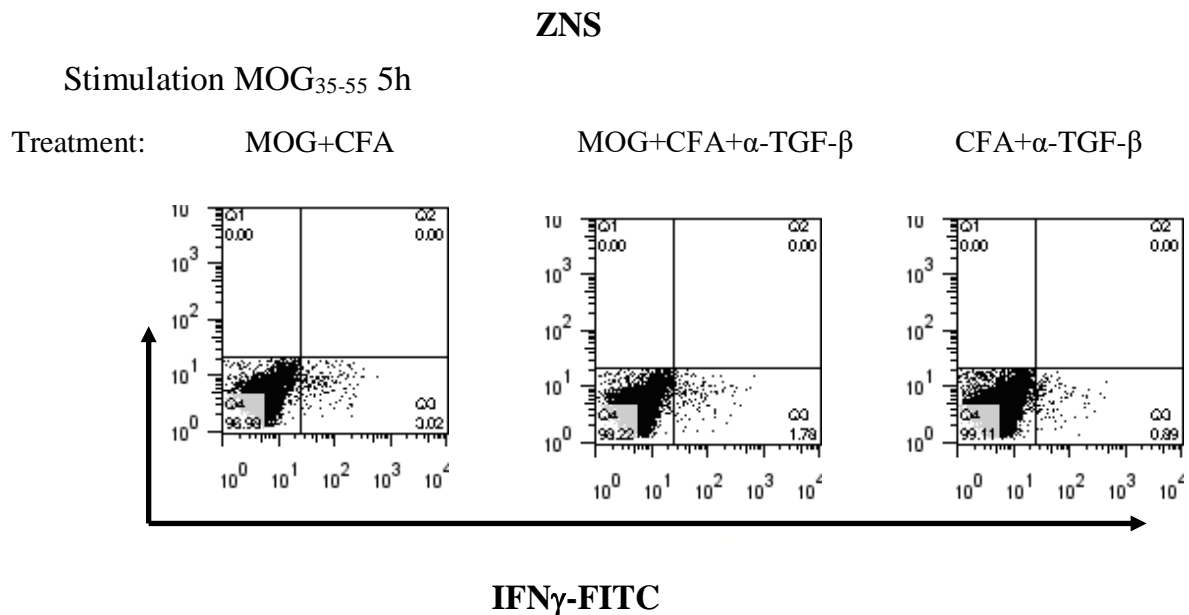


Abb. 3.15 Auswertung der FACS-Analyse nach stereotaktischer intrazerebellärer Induktion mit MOG bei den Tieren der CA-Linie. Auf der Ordinate sind CD8+T-Zellen, auf der Abszisse IFN- γ dargestellt. Die Versuchstiere wurden mit 3 unterschiedlich zusammengesetzten Emulsionen bei einer MOG-Konzentration von 37 mg/ml sowie CD4+2D2-Lymphozyten induziert. Nach Beendigung der klinischen Beobachtungsphase von 12 Tagen, erfolgte eine Lymphozytenextraktion aus dem ZNS zur Analyse mit dem FACS-Gerät. Dargestellt ist die IFN- γ Produktion nach 5 stündiger spezifischer Stimulation mit MOG₃₅₋₅₅. Es zeigte sich die höchste Expression in der MOG/CFA Gruppe mit 3,02%, gefolgt von 1,78% in der MOG/CFA + α -TGF- β Gruppe.

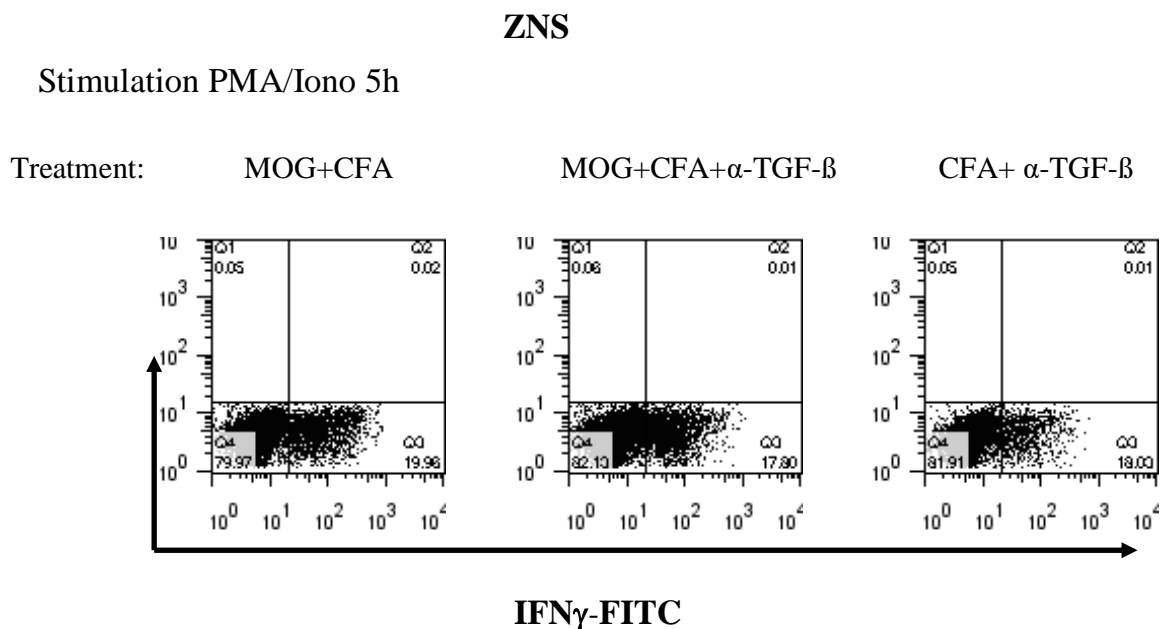


Abb. 3.16 Auswertung der FACS-Analyse nach stereotaktischer intrazerebellärer Induktion mit MOG bei den Tieren der CA-Linie. Auf der Ordinate sind CD8+T-Zellen, auf der Abszisse IFN- γ dargestellt. Die Versuchstiere wurden mit 3 unterschiedlich zusammengesetzten Emulsionen bei einer MOG-Konzentration von 37 mg/ml sowie CD4+2D2 Lymphozyten induziert. Nach Beendigung der klinischen Beobachtungsphase von 12 Tagen, erfolgte eine Lymphozytenextraktion aus dem ZNS zur Analyse mit dem FACS-Gerät. Dargestellt ist die unspezifische Stimulation der T-Zellen mit PMA/Ionomycin über 5 Stunden. Es zeigt sich in allen 3 Gruppen in etwa die gleiche Expression von IFN- γ : 17,8, 18,00 und 19,98%

3.4.2 FACS Analyse nach 18 stündiger Stimulation

Bei der spezifischen Stimulation über 5 Stunden sahen wir nur eine geringe Produktion von IL-17 bzw. IFN- γ . Die Überlegung war nun, dass die Stimulation der T-Zellen möglicherweise zu kurz gewählt war, so dass wir uns entschieden den Versuchsaufbau zu wiederholen, um diesmal die T-Zellen über einen längeren Zeitraum von 18 Stunden zu stimulieren. Die Versuchstiere der CA-Linie aus der OP Serie 7 erhielten alle eine zusätzliche Injektion mit CD4+2D2-Lymphozyten und lassen sich bezüglich der verabreichten Emulsion in drei Gruppen einteilen:

1. MOG/CFA + α -TGF- β : n=4
2. MOG/CFA: n=2
3. CFA+ α -TGF- β : n=4

In der Gruppe 1 (MOG/CFA + α -TGF- β) produzierten 0,27% der CD4+T-Zellen IL-17, in der Gruppe 3 (CFA+ α -TGF- β) waren es 0,28% und in der Gruppe 2 (MOG/CFA) 0,18% der CD4+T-Zellen.

IFN- γ wurde in der Gruppe 1 von 0,36% der CD4+T-Zellen synthetisiert, in der Gruppe 2 (MOG/CFA) waren es 0,17% und in der Gruppe 3 (CFA+ α -TGF- β) 0,44% der T-Zellen.

Durch die verlängerte Stimulationsdauer von 18 Stunden stieg bei der Gruppe 3 (CFA+ α -TGF- β) die Anzahl der IL-17 produzierenden T-Zellen von 0,13% auf 0,28%. Bei der Gruppe 1 (MOG/CFA + α -TGF- β) zeigte die verlängerte Stimulationsdauer keinen Effekt auf die T-Zellen (0,24 % bei 5 stündiger bzw. 0,28% der IL-17 sezernierenden T-Zellen bei 18 stündiger Stimulation). Bei Gruppe 2 (MOG/CFA) blieb der Anteil der T-Zellen etwa gleich (0,18%).

Der Effekt einer zusätzlichen intrazerebellären Injektion von α -TGF- β zeigt sich beim Vergleich der Gruppe 1 und 2. So ist die Anzahl der IL-17 produzierenden T-Zellen bei der MOG/CFA+ α -TGF- β Gruppe sowohl bei 5 stündiger (0,24%) als auch bei 18 stündiger Stimulation (0,27%) deutlich höher als bei der MOG/CFA Gruppe (*siehe Tabelle 3.4*).

Die höchste IFN- γ Produktion (3,02 % der T-Zellen) sahen wir bei 5 stündiger Stimulation in der Gruppe 2 (MOG/CFA) wohingegen bei 18 stündiger Stimulation nur 0,17% der T-Zellen eine IFN- γ Synthese aufwiesen.

Insgesamt lassen sich die extrahierten T-Lymphozyten stimulieren, zeigen jedoch eine nur geringe Zytokinsynthese von IFN- γ sowie IL-17.

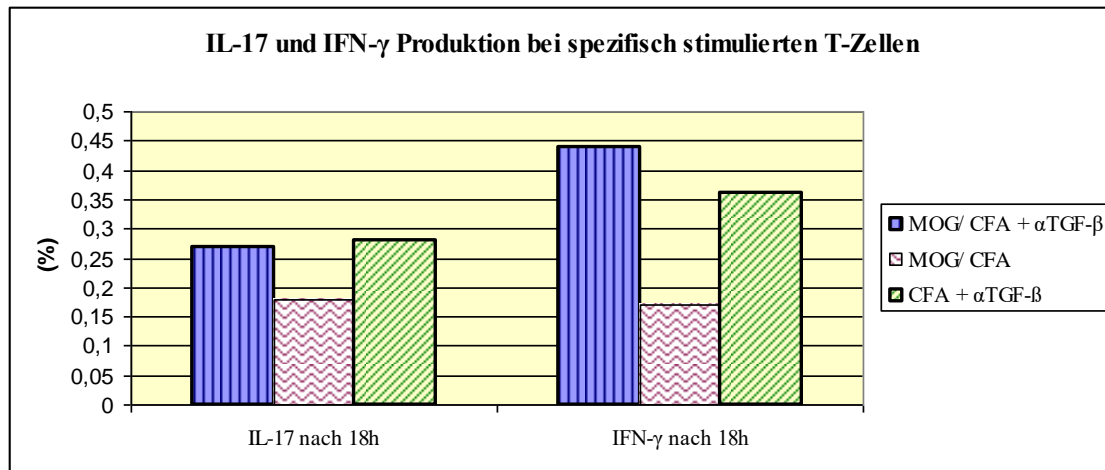


Abb. 3.18 Produktion von IL-17 und IFN- γ bei spezifisch stimulierten T-Zellen. Die Zellen wurden für 18 Stunden mit MOG₃₅₋₅₅ stimuliert. Es zeigt sich die höchste Expression bei IFN- γ nach 18 Stunden in der MOG/CFA + α -TGF- β Gruppe

	MOG+CFA+ α -TGF- β	MOG+CFA	CFA+ α -TGF- β
IL-17 Produktion Stimulation 5 h	0,24	0,12	0,13
IL-17 Produktion Stimulation 18 h	0,27	0,18	0,28
IFN-γ Produktion Stimulation 5 h	1,78	3,02	0,89
IFN-γ Produktion Stimulation nach 18 h	0,44	0,17	0,36

Tabelle 3.4 Darstellung der IL-17- und IFN- γ -Werte nach spezifischer Stimulation der T-Zellen. Vergleich der Werte nach 5 und 18 stündiger Stimulation mit MOG₃₅₋₅₅. Die Versuchstiere der CA-Linie (n=20) erhielten drei unterschiedlich zusammengesetzte Emulsionen zur intrazerebralen Induktion sowie eine adjuvante Gabe von CD4+2D2Lymphozyten. Die Tiere wurden am 12. postoperativen Tag getötet und deren, aus dem Kleinhirn extrahierten, Lymphozyten mittels FACS-Analyse untersucht.

ZNS MOG 100 µg/ml 18h

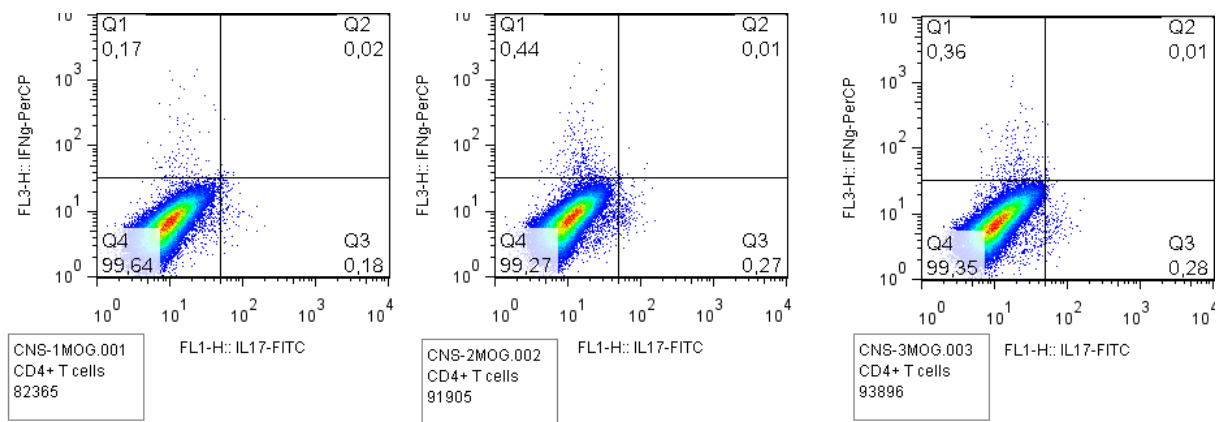


Abb. 3.16 Auswertung der FACS-Analyse nach stereotaktischer intrazerebellärer Induktion mit MOG bei der CA-Linie. Die Versuchstiere wurden mit 3 unterschiedlich zusammengesetzten Emulsionen bei einer MOG-Konzentration von 37 mg/ml sowie CD4+2D2Lymphozyten induziert. Nach Beendigung der klinischen Beobachtungsphase von 12 Tagen, erfolgte eine Lymphozytenextraktion aus dem ZNS zur Analyse mit dem FACS-Gerät. Dargestellt ist die Expression von IL-17 und IFN- γ nach 18 stündiger spezifischer Stimulation der T-Zellen mit MOG35-55. Die Gruppen von links nach rechts: MOG/CFA, MOG/CFA + α -TGF- β und CFA + α -TGF- β . Die höchste Expression des IL-17 besteht in den letzten 2 Gruppen: 0,27% in der MOG/CFA + α -TGF- β und 0,28% in der CFA + α -TGF- β Gruppe. Die Expression von IFN- γ ist dabei mit 0,44% in der MOG/CFA + α -TGF- β Gruppe am höchsten, gefolgt von 0,36% in der CFA + α -TGF- β Gruppe.

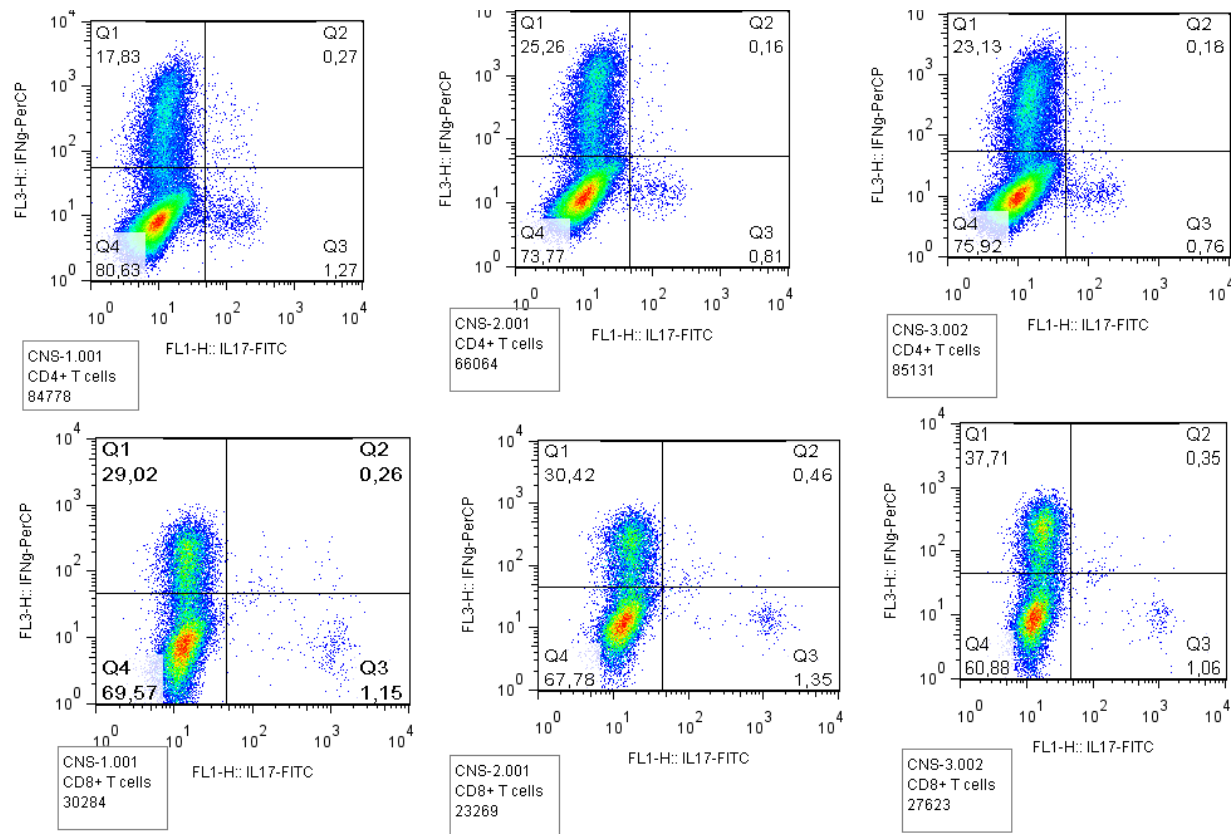


Abb. 3.17 Auswertung der FACS-Analyse nach stereotaktischer intrazerebellärer Induktion mit MOG bei der CA-Linie. Die Versuchstiere wurden mit 3 unterschiedlich zusammengesetzten Emulsionen bei einer MOG-Konzentration von 37 mg/ml sowie CD4+2D2 Lymphozyten intrazerebral immunisiert. Nach Beendigung der klinischen Beobachtungsphase von 12 Tagen, erfolgte eine Lymphozytenextraktion aus dem ZNS zur Analyse mit dem FACS-Gerät. Dargestellt ist die Expression von IL-17 und IFN- γ nach 4 stündiger unspezifischer Stimulation der T-Zellen mit PMA/Ionomycin. Die Gruppen von links nach rechts: MOG/CFA, MOG/CFA + α -TGF- β und CFA + α -TGF- β .

4 Diskussion

Zur Klärung der Ätiologie sowie der Pathogenese der MS wurde schon früh ein tierexperimentelles Modell entwickelt. Die Beschreibung der ersten EAE erfolgte 1933 durch die Arbeitsgruppe Rivers et al (89). Die EAE-Induktion bei den Versuchstieren (Rhesusaffen) erfolgte dabei durch mehrfache Injektionen von Hirnextrakten aus Kaninchen über Wochen, um eine Immunantwort auszulösen. Nach Entwicklung eines auf Öl basierten Adjuvans durch Jules Freund 1951 wurde die Anzahl der Injektionen auf lediglich eine gesenkt und die Induktion somit erheblich erleichtert (49). Die Induktion einer ausschließlich auf das ZNS begrenzten zerebralen Immunreaktion anhand eines EAE-Modells ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Mit dem hier etablierten Modell versuchten wir herauszufinden, ob eine Immunantwort im ZNS ohne die Beteiligung des peripheren Immunsystems überhaupt auslösbar ist und wie wichtig dabei das Immunprivileg des ZNS ist. Es wurde u.a. untersucht in welchem Ausmaß die Lymphozyten im ZNS aktivierbar sind und eine Entzündung ausgelöst werden kann.

Zur Modell-Etablierung mussten die Koordinaten sowie die Zusammensetzung der Emulsion bedacht werden, da die üblichen Kriterien für die Induktion einer EAE auf das ZNS nicht angewendet werden können. Dafür wurde die speziell entwickelte CA-Tierlinie untersucht. Die aus den Experimenten gewonnenen Erkenntnisse sollten zu einem besseren Verständnis der Ätiologie von ZNS-Erkrankungen wie der MS führen.

4.1 Etablierung des Modells

Als Vorlage nutzten wir zwei bestehende Modelle: das Protokoll zur Induktion einer peripheren EAE sowie die Koordinaten zur stereotaktischen Injektion in das Kleinhirn und die OP-Prozedur von M.Vetter.

Das Modell wurde in mehreren OP-Serien etabliert, wobei sich einige Schwierigkeiten zeigten. Die Koordinaten von M.Vetter (107) für eine Injektion in das Kleinhirn der GF-IL-12 Mauslinie konnten nicht unverändert übernommen werden, weil im Modell der vorliegenden Arbeit jüngere und damit kleinere Mäuse operiert wurden. Es war entscheidend jüngere Tiere der CA-Linie zu operieren, um das Auftreten einer spontanen Inflammation im ZNS, welche bei diesen Tieren bereits ab der 12. Lebenswoche auftritt, zu vermeiden. So unterschieden sich die Tiere in ihrer Größe nicht nur in den verschiedenen Tierlinien, sondern auch innerhalb der CA-Linie. Die Weibchen dieser Linie waren nochmals kleiner als die operierten männlichen Tiere. Bei der Serie 6 wog beispielsweise ein männliches Tier 26 g, ein weibliches dagegen nur 17,3 g. Die Tiere der C57Bl/6- sowie der MyD88^{-/-}-Linie waren durchschnittlich größer als die Tiere der CA-Linie. Dadurch gelangte bei einigen sehr kleinen Tieren die Emulsion bei unveränderten Koordinaten nicht nur in die rechte Kleinhirnhemisphäre, sondern teilweise in das Ventrikelsystem, was bei den Tieren zum Verkleben der drainierenden Ventrikelwege und infolgedessen zu Liquorstau und erhöhtem Hirndruck führte. Zwei Versuchstiere der CA-Linie mussten deshalb vorzeitig getötet werden. Durch die Drainage der Emulsion in das Ventrikelsystem könnten die Ergebnisse dementsprechend verfälscht worden sein. So wäre es möglich, dass bei kleineren Tieren nur wenige Bestandteile der Emulsion im Kleinhirn verblieben und der Rest über das Ventrikelsystem abgeflossen ist. Auf diesem Weg könnte die Emulsion auch in die Halslymphknoten gelangt sein, was die Granulom-artigen Läsionen in den Halslymphknoten einzelner Tiere aus den Anfangsexperimenten mit höheren Emulsionsvolumina erklären würde. Auf Grund dieser Schwierigkeiten wäre es zu überdenken, sehr leichte Tiere entweder vom Experiment auszuschließen oder die Koordinaten für die x- und y-Achse an der stereotaktischen Einheit anzupassen. Bei sehr leichten Tieren muss davon ausgegangen werden, dass auch bei Fehlen der klinischen Symptomatik wie bspw. erhöhtem Hirndruck, Anteile der Emulsion in das Ventrikelsystem drainierten. So wäre es möglich, dass zu wenig MOG-Antigen im Kleinhirn verblieb und dadurch eine Immunreaktion im ZNS bei diesen Tieren nicht ausgelöst werden konnte.

Ein weiteres Problem stellte das in den Experimenten von M.Vetter verwendete Volumen von 10 µl dar. Bei intrazerebellären Injektionen mit wässrigen Lösungen vertrugen die Versuchstiere dieses Volumen problemlos, da dieses während der Injektion über 10 Minuten

gut in das Hirngewebe diffundieren kann. Bei einer Emulsion jedoch erwiesen sich diese 10 µl als problematisch, weil die Emulsion sich nicht im Gewebe verteilen konnte, sondern sich im Hirngewebe verdrängend verhielt und dementsprechend nur deutlich kleinere Volumina möglich sind. Das erste Anzeichen war das Auslaufen aus dem Trepanationsloch während der Injektion. Das Bilden einer zusätzlichen Tasche von 0,3 mm an der z-Koordinate verhinderte zwar das Auslaufen der Emulsion, jedoch zeigten sich in den histologischen Untersuchungen sehr große Raumforderungen, die teilweise mehr als $\frac{3}{4}$ der rechten Kleinhirnhemisphäre einnahmen. Bei den Versuchen war es jedoch wichtig, das Gewebe des Kleinhirns so wenig wie möglich zu schädigen, um später dort eine Immunreaktion zu untersuchen. Deswegen wurde das Volumen im Verlauf der Etablierung des Verfahrens auf 3 µl gesenkt, weshalb wir wiederum die MOG-Konzentration erhöhen mussten, um eine Mindestmenge an Antigen in das Kleinhirn applizieren zu können. Anhand dieser Beobachtung zeigt es sich, wie entscheidend die Konsistenz einer Lösung ist, welche intrazerebral appliziert wird. So sollte die Viskosität, die Applikationsdauer sowie das Volumen immer berücksichtigt werden. Es ist deutlich einfacher, mit einer wässrigen Lösung zu arbeiten, da hierbei die Größe des Gehirns der Tiere das Experiment geringer beeinflusst, weil diese im Hirngewebe gut diffundieren kann und der exakte Applikationsort nicht so ausschlaggebend wie bei einer viskösen Lösung ist.

4.2 Klinische Symptomatik der operierten Versuchstiere

Bei der klinischen Beobachtungsphase wurde bei vielen operierten Tieren der CA-Linie, die Ataxie als Leitsymptom beobachtet. Zu weiteren klinischen Zeichen der EAE wie Hinterpfotenlähmung ist es in nur einigen Ausnahmen in Form einer milden Ausprägung gekommen, welche sich jedoch wieder rasch zurückbildete.

Bei den Tieren der transgenen CA-Linie ist es jedoch am schwierigsten die Ataxie als ein Symptom der induzierten zerebralen Immunantwort zu werten. Diese Versuchstiere entwickeln im Laufe ihres Lebens auf Grund der transgenen IL-12 Expression im Kleinhirn zu unterschiedlichen Zeitpunkten jenseits von etwa der 12. Lebenswoche eine spontane Inflammation, die klinisch mit Ataxie und mikroskopisch mit starken Verkalkungen (*siehe 3.3, Abb. 3.12*) im Kleinhirn einhergeht (82). Da einige Tiere weit über 30 Tage postoperativ beobachtet wurden, war damit zu rechnen, dass sie im Verlauf eine spontane Ataxie entwickeln würden. Darüber hinaus galt es zu bedenken, dass auch der operative Eingriff in den IL-12 exprimierenden Tieren zu einer Verstärkung bzw. zu einem früheren Auftreten der Symptomatik führen könnte. Allerdings entwickelten einige der Tiere zusätzlich zur ataktischen Symptomatik Schwanzlähmungen, was wiederum für eine stattgefundene zerebrale Immunantwort sprach. Eine Differenzierung zwischen einer induzierten Ataxie und einer spontan auftretenden Ataxie der CA-Linie war in der Klinik dennoch schwierig. Wenn man jedoch das ataktische Gangbild der nicht operierten älteren Tiere mit dem der induzierten Tiere verglich, sahen wir häufig ein Kreisen, welches bei spontaner Ataxie fehlte.

Bei den histologischen Untersuchungen der operierten Versuchstiere, welche mit einem Volumen von 5 μ l und einer MOG-Konzentration von 2 mg/ml induziert wurden, zeigten sich klinisch fast keine pathologischen Auffälligkeiten, wohingegen Tiere, die mit einem geringerem Volumen von 3 μ l und derselben MOG-Konzentration operiert wurden, Ataxien aufwiesen. Hier stellt sich die Frage warum Versuchstiere bei denen ein höheres Volumen appliziert wurde, keine klinische Symptomatik entwickelten. Eine Erklärung hierfür kann durch die bereits beschriebene anatomische Nähe des IV. Ventrikels begründet sein. Bei einem für das Kleinhirn hohen Volumen von 5 μ l, kann es sein, dass durch die Ventrikeldrainage nur wenig Emulsion zerebellär verbleiben konnte. Der zu geringe Bestandteil der Emulsion reichte vermutlich nicht aus, um eine Immunantwort auszulösen.

Obwohl wir in unserem Experiment klinische Symptome beobachteten, entsprachen diese nicht der „klassischen“ EAE-Symptomatik. Wir gehen davon aus, dass durch einen ausgeprägten Entzündungsreiz bei der zerebellären Induktion einer Immunreaktion die aktivierten Lymphozyten lokal durch den chemotaktischen Reiz im Kleinhirn „festgehalten“ werden und

nicht wie bei der peripher induzierten EAE bis in das Rückenmark oder die übrigen Anteile des ZNS wandern. Deshalb zeigte sich bei den Versuchstieren eine ausgeprägte Ataxie, wohingegen Lähmungserscheinungen nicht vorrangig auftraten. Eine andere Erklärung könnte die etwas höhere IL-17 Produktion im Vergleich zum IFN- γ sein, die bei einer EAE mit eher atypischen Symptomen wie Ataxie einhergeht (97).

Bei den Tieren der IL-12p40^{-/-}-Mauslinie entwickelte sich nur in einigen Fällen eine Ataxie, welche allerdings im Verlauf verschwand. Dies ist insofern erwartungsgemäß, da den Tieren die Untereinheiten der Zytokine IL-12 und IL-23 fehlen und wie in der Einleitung bereits beschrieben, durch periphere Induktion keine EAE auslösbar ist. Die beobachtete Ataxie könnte als temporäre Reaktion auf die Operation am Kleinhirn gewertet werden, bei der es u.a. zu kleinen lokalen Einblutungen kommen kann, die im Verlauf resorbiert werden.

Die Tiere der MyD88^{-/-}-Linie entwickelte keine klinischen Symptome. Wir sahen bei den Tieren auch keine Abszesse oder sonstige Anzeichen für eine Infektion. Somit ist es unwahrscheinlich, dass die Ursache für Granulom-artige Läsionen bzw. differentialdiagnostisch Abszesse, die wir bei den Tieren der CA- und der IL-12p40^{-/-}-Linie gesehen haben, auf eine perioperative Kontamination zurückzuführen war, sondern eher als Reaktion auf das CFA gewertet werden kann.

Vereinzelte Tiere der C57Bl/6-Linie hingegen entwickelten eine milde Ataxie, die nach einigen Tagen sistierte. Bei diesen Tieren allerdings erwarteten wir eine insgesamt mildere Ausprägung der klinischen Symptomatik als bei den Tieren der CA-Linie.

Einige Tiere der CA-Linie erhielten als Negativ-Kontrolle eine nur CFA-haltige Emulsion. Erwartungsgemäß sollten dabei keine MOG-spezifischen Symptome beobachtet werden. Die Tiere entwickelten jedoch ebenfalls eine Ataxie. Dies lässt sich wiederum zum einen durch die spontane Inflammation im ZNS der CA-Linie, zum anderen durch den gesetzten sterilen operativen Reiz im Kleinhirn erklären. Daher konnte die Ataxie bei MOG-induzierten Tieren nicht als eine spezifische Reaktion gewertet werden. Das bedeutet wiederum, dass eine klinische Beurteilung allein nicht ausreicht, um eine Aussage zu treffen, ob eine zerebrale Immunreaktion tatsächlich induziert wurde. Bei den histologischen Befunden sahen wir zwar eine Inflammation mit aktivierten Immunzellen, wissen jedoch nicht, ob diese tatsächlich MOG-spezifisch waren. Um dies zu untersuchen, entschieden wir uns zur Durchführung von FACS-Analysen.

4.3 Ursache der zervikalen Granulom-artigen Läsionen

Drei Tiere (CA: n=1, IL-12p40^{-/-}: n=2) entwickelten im Verlauf der klinischen Beobachtungsphase zervikale Raumforderungen. Als Ursache vermuteten wir zunächst eine bakterielle perioperative Kontamination. Dem ZNS fehlt es grundsätzlich an lymphatischen Gefäßen über welche die Antigene zu den Lymphorganen gelangen. Jedoch können die Pathogene über den Weg der Liquordrainage durch die Lamina cribrosa in die zervikalen Lymphknoten gelangen (108). Es könnte sein, dass bei den betroffenen Tieren die Emulsion zu einem gewissen Anteil in das Ventrikelsystem injiziert und darüber in die zervikalen Lymphknoten drainiert wurde. Dort kann es durch das CFA bzw. durch eine bakterielle Kontamination zu einer Inflammation mit der Folge der beobachteten Läsionen gekommen sein. Zwei Tiere der IL-12p40^{-/-}-Linie hatten eine Emulsion mit einem Volumen von 5 µl erhalten, dabei kann es, wie bereits oben beschrieben, durchaus zu einer stärkeren Drainage in das Ventrikelsystem gekommen sein. Eine weitere Ursache für die zervikalen Läsionen könnte die mikrobielle Last in der Umluft sein, die zu einer perioperativen Kontamination führte. Die stereotaktischen Operationen erfolgten in einem Labor ohne eine spezielle Absaug- und Filtervorrichtung. Bereits in Operationssälen mit Luftfiltration besteht jedoch die Gefahr einer bakteriellen Kontamination, die proportional zur Operationsdauer ansteigt (1). Es zeigte sich bei Auswertungen allerdings, dass diese Versuchsmäuse in der Reihenfolge der Operationen eher in der Mitte angesiedelt waren. Die Versuchstiere, welche vor oder nach diesen Tieren operiert wurden, entwickelten keinerlei bakterielle Infektionen oder gar Abszesse. Zusätzlich testeten wir die Tiere der MyD88^{-/-}-Linie zur Kontrolle, welche bei einer möglichen perioperativen bakteriellen Kontamination auf Grund des genetischen Hintergrundes eine ausgeprägte Infektion entwickeln würde. Den Tieren ging es jedoch während des gesamten postoperativen Beobachtungszeitraumes gut. Somit lassen sich die Granulom-artigen Läsionen am Hals am wahrscheinlichsten als Reaktion auf das CFA und nicht als Abszesse werten. Zudem sahen wir in histomorphologischen Untersuchungen lediglich eine Lymphozyteninfiltration und keine Granulozyten.

4.4 Morphologische Veränderungen infolge einer Inflammation

Die histopathologischen Schnitte der untersuchten CA-Tiere zeigten deutliche Entzündungszeichen wie Lymphozyteninfiltration sowie morphologische Veränderungen in Form von Gewebeauflockerung. Die immunhistologischen Untersuchungen zeigten ebenfalls eine nachweisbare sowohl diffuse als auch lokal, rund um die Emulsionsstelle liegende Infiltration mit Lymphozyten vom CD4-, CD8- und CD45-Typ sowie Makrophagen.

Dabei kann von einer Inflammation infolge der Operationen im Kleinhirn der operierten Tiere ausgegangen werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen ließe sich eine Entzündung infolge einer zerebral induzierten EAE beweisen.

Die Inflammation könnte jedoch auch als steriler Entzündungsreiz nach der Kleinhirnoperation gewertet werden. Zum Vergleich wäre es möglich gewesen ein Versuchstier ohne die Injektion einer Lösung zu operieren.

4.5 FACS Analysen

Bei den histologischen Untersuchungen des ZNS der Versuchstiere sahen wir eindeutige Zeichen einer Inflammation. In den immunhistochemischen Färbungen konnten wir u.a. aktivierte T- und B-Zellen nachweisen. Diese Befunde sprechen für eine erfolgreiche Immunantwort im ZNS. Die klinische Symptomatik der Tiere entsprach jedoch nicht den typischen bisher in der Literatur beschriebenen Symptomen. Um einen endgültigen Beweis für eine stattgefundene zerebrale Immunreaktion zu erbringen, wurden die aktivierten Lymphozyten mit Hilfe von FACS Analysen untersucht. So konnte verifiziert werden, inwieweit die Lymphozyten MOG-spezifisch aktiviert wurden.

Die CD4+T-Zellen wurden aus den Tieren verschiedener Versuchsgruppen extrahiert. So verabreichten wir einigen Tieren zur Verstärkung der Immunantwort CD4+2D2-Lymphozyten oder Ptx sowie Antikörper gegen TGF- β . Die Versuchstiere in der Gruppe zur Negativkontrolle erhielten kein MOG, sondern eine CFA-haltige Emulsion. Es war interessant zu sehen, ob die CD4+2D2-Lymphozyten sowie α -TGF- β einen positiven Effekt auf die Produktion der Zytokine hatte. Bei der Serie 7 wurden die T-Zellen über 5 Stunden spezifisch mit MOG stimuliert. Hier sah man einen immunverstärkenden Effekt bei gleichzeitiger Applikation von MOG, CD4+2D2-Lymphozyten sowie Antikörpern gegen TGF- β bei der IL-17 Produktion. In dieser Gruppe waren 0,24% der CD4+T-Zellen aktiviert, doppelt so viele wie bei einer alleinigen Gabe von MOG (0,12%). Bei der nächsten FACS Analyse untersuchten wir welche Auswirkung eine längere Stimulationsdauer von 18 Stunden auf die T-Zellen gleichen Versuchsaufbaus hatte. In dieser Analyse zeigten sich fast keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Interessant war hier, dass 0,27% der CD4+T-Zellen aus der CFA/ α -TGF- β Gruppe, der Negativkontrolle also, IL-17 synthetisierten. In der MOG-stimulierten Gruppe waren es lediglich 0,18% der CD4+T-Zellen, die spezifisch reagierten.

Die Analyse der IFN- γ Expression lässt ebenfalls keine eindeutige Schlussfolgerung zu. Nach 5 stündiger spezifischer Stimulation der extrahierten CD4+T-Zellen zeigte sich die höchste Expression in der MOG/CFA-Gruppe mit 3,02%. In der MOG-Gruppe mit zusätzlicher Verabreichung von α -TGF- β sind nur 1,78% der T-Zellen aktiviert. Das α -TGF- β schien hier also keine größeren Auswirkungen zu haben, sondern führte sogar zu einer niedrigeren Expression. Nach längerer Stimulationsdauer von 18 Stunden war der α -TGF- β Effekt bei der MOG/CFA-Gruppe mit nur 0,44% aktivierter CD4+T-Zellen sogar am geringsten ausgeprägt. Dies ließe sich durch eine nicht zielgenaue Injektion der Lösung in das Kleinhirn mit einer daraus resultierenden Drainage der Emulsion über das Ventrikelsystem erklären.

Insgesamt zeigen die FACS Analysen der zerebral induzierten Immunantwort, dass 0,2-3% der Th1- und Th17- Zellen eine IFN- γ bzw. IL-17 Produktion aufwiesen. Vergleicht man diese Zahlen mit aktivierten T-Zellen bei einer klassischen, peripher induzierten EAE, sehen wir ähnlich wenige MOG-spezifisch aktivierte CD4+T-Zellen. So wurden beispielsweise in der Arbeit von Cross et al, in frischen Läsionen im ZNS nur < 1,5% von MBP spezifischen Zellen nachgewiesen (26). In einer anderen Arbeit von Mony et al. produzierten 7% der CD4+T-Zellen IFN- γ und < 1% IL-17 (74). Die geringe Anzahl der aktivierten T-Zellen ist also keineswegs als Zeichen einer nicht erfolgreichen zerebralen Immunantwort, sondern ist kompatibel mit den Befunden einer klassisch induzierten EAE.

4.6 Ist die Induktion einer zerebralen Immunreaktion gelungen?

Die technische Umsetzung, wie die Injektion der Emulsion an die korrekte Lokalisation in die rechte Kleinhirnhemisphäre, ist in den meisten Fällen gelungen. Bei Versuchstieren mit kleinerem Ausgangsgewicht müssten die Koordinaten eventuell modifiziert werden, um einen Übertritt der Emulsion in das Ventrikelsystem zu vermeiden. Im Vergleich zur peripher induzierten EAE war bei den Versuchstieren ebenfalls eine dezentere klinische Symptomatik zu beobachten. Die histopathologischen sowie immunhistochemischen Untersuchungen zeigen eine Inflammation im ZNS. Die FACS-Analysen zeigen nur einen geringen Prozentsatz von Lymphozyten, welche die Zytokine IFN- γ und IL-17 exprimierten. In der peripher induzierten EAE werden ebenfalls nur wenige spezifische Lymphozyten gefunden (26,74).

Eine Antigenpräsentation im ZNS könnte durch die Mikroglia beispielsweise in den Virchow-Robin Räumen stattfinden. Diese läuft allerdings klassischerweise nicht wie in den sekundären Lymphorganen ab, da die T-Zellen zwar aktiviert werden können, jedoch keinen Reiz zur Proliferation durch die Mikroglia erhalten. Dafür kommt es auf deren Oberfläche zu einer erhöhten Expression der Aktivitätsmarker wie CD25 und CD134 sowie zu einer gesteigerten Zytokinexpression von TNF- α und IFN- γ (6). CD25 induziert u.a. die Expression des IL-2, das im Gegenzug als ein negativer Regulator der Th17-Zellen fungieren und somit eine Immunantwort supprimieren kann (62). Im Normalfall exprimieren die Mikroglia nur wenige MHC II Moleküle. Bei einer Virusinvasion bspw. resultiert jedoch durch die infizierten Zellen eine hohe lokale Produktion von INF- γ , welches wiederum eine erhöhte Expression der MHC Moleküle auf der Mikroglia-Oberfläche fördert. Auf Grund dieser Aktivierung fungieren die Mikroglia verstärkt als Antigen-präsentierende Zellen und produzieren dadurch vermehrt entzündungsfördernde Chemokine. Darüber hinaus führt die vermehrte lokale Freisetzung von IFN- γ zu einer positiven Regulation der Adhäsionsmoleküle an benachbarten endothelialen Zellen der BHS, welches die Migration weiterer T-Zellen in das ZNS erleichtert. Insbesondere die CD4+Th1-Zellen führen zu einer starken Aktivierung der Mikroglia und einer enormen Ausschüttung von Chemokinen (29). Dabei erfolgt die Differenzierung der T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten oder der Milz. Die dort aktivierten T-Zellen wandern, ausgelöst durch den chemotaktischen Reiz, durch die BHS in das ZNS und setzen dort weitere entzündungsfördernde Prozesse in Gang (29). In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir Mäuse auf einem IL-12p40^{-/-} Hintergrund, die abgesehen von der zerebralen IL-12 Produktion in Astrozyten weder IL-12 noch IL-23 produzieren können. In diesen Tieren kann folglich eine Immunreaktion wie bei der Induktion einer zerebralen Immunreaktion nicht in den Lymphorganen ausgelöst werden.

Der niedrige Prozentsatz der CD4⁺T-Zellen, welche IL-17 und IFN- γ synthetisierten, deutet darauf hin, dass die positive Regulation der Mikroglia bezüglich der MHC-Expression nur sehr langsam geschieht und dass nicht genügend Signale zur T-Zellaktivierung, wie beispielsweise der Reiz zur Proliferation, vorhanden sind. Eine geringe Chemokinfreisetzung sowie das Vorhandensein entzündungshemmender Zytokine und Zellen wie beispielsweise TGF- β , IL-2 oder aktivierter Treg-Zellen im Hirngewebe könnten eine Immunantwort supprimieren (62, 48). Auf der anderen Seite ist der Prozentsatz spezifischer T-Zellen im ZNS auch bei der peripher induzierten EAE nur im einstelligen Bereich, d.h. allein auf Grund dieser Werte ist eine gelungene Antigenpräsentation nicht auszuschließen. Bei den OP-Serien mit vorangehender Applikation des Antikörpers gegen TGF- β konnte klinisch eine stärkere Symptomatik sowie eine etwas erhöhte IL-17 Expression in den FACS-Analysen gemessen werden.

Die Arbeiten von Miller et al zeigen außerdem, dass die hauptsächlich dendritischen Zellen in den ZNS-Läsionen eingewanderte Zellen aus der Peripherie sind (72). Das deutet darauf hin, dass Mikroglia allein für eine Aktivierung der T-Zellen vielleicht nicht ausreichen.

Die typische EAE, vermittelt durch Th1-Zellen, zeichnet sich durch eine kaudokraniale aufsteigende Paralyse aus. Die hier frei beweglichen Lymphozyten migrieren bspw. über den Plexus choroideus in das ZNS und induzieren dort eine entsprechende Entzündung. Die atypische EAE hingegen äußert sich in Form eines ataktischen Gangbildes, ausgelöst durch die zellvermittelte Th17-Immunreaktion. Untersuchungen von Stromnes et al. zeigen, dass je höher die Konzentration der Th17-Zellen in ZNS-Läsionen ist, umso atypischer die Ausbildung einer EAE (97). Aktuelle Arbeiten zeigen ebenfalls, dass beim Fehlen von IFN- γ während der EAE die ataktischen Symptome, wie bspw. Kreisen, im Vordergrund stehen und die typischen Lähmungserscheinungen fehlen (63). In unseren Experimenten zeigte sich eher das Bild einer atypischen EAE bei welcher die Symptome der Ataxie mit u.a. Kreisen deutlich im Vordergrund standen. Die IL-17 Expression war gegenüber der IFN- γ Produktion allerdings nicht erhöht. Es lässt sich, wie bereits oben erwähnt, auch bei der peripher induzierten EAE keine hohe Expression von IL-17 nachweisen. So kann das beobachtete ataktische Gangbild in der vorliegenden Arbeit durchaus auf die IL-17 Expression in den Kleinhirn-Läsionen zurückzuführen sein. Es wäre denkbar, dass durch die hohe IL-12 Expression im Kleinhirn der hier verwendeten Tiere der CA-Linie, die aktivierten und stimulierten Th1- und Th17-Zellen einen starken chemotaktischen Reiz erfahren, so dass sie nicht aus dem Kleinhirn migrieren können und die für die EAE normalerweise typische Lähmung induzieren. In diesem Fall ließe sich bei den Tieren klinisch lediglich eine Ataxie beobachten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Immunreaktion des ZNS. Eine ausgeprägte klinische Symptomatik wie bei der peripher induzierten EAE lässt sich trotz hoher MOG-Konzentration in der Emulsion, Verabreichung von TGF- β Antikörpern sowie Verstärkung einer Immunantwort durch zusätzliche Gabe von CD4+2D2-Lymphozyten oder Ptx nicht erreichen. Möglicherweise ist das „Immunprivileg“ des ZNS ausschlaggebend, bei dem es auf Grund des immunologischen Sonderstatus zu einer reduzierten Aktivierbarkeit des sowohl spezifischen als auch unspezifischen Immunsystems kommt (21). Dies lässt sich zum einen durch die erhöhte Akkumulation von Treg-Zellen im entzündeten ZNS Gewebe (93), zum anderen durch die mangelhafte Aktivierung der naiven T-Zellen durch residente Antigenpräsentierende Zellen erklären. Es konnte gezeigt werden, dass die Mikroglia sowie in das ZNS eingewanderte dendritische Zellen, die sich in Richtung der „Mikroglia-like Cells“ ausbilden, die Proliferation der CD4+T-Zellen sogar supprimieren und somit das „Immunprivileg“ des ZNS aufrechterhalten (5).

Die Induktion einer zerebralen Immunreaktion durch stereotaktische ZNS-Operation war zwar prinzipiell möglich, jedoch beobachteten wir eine deutlich schwächere Immunreaktion als bei der peripher induzierten EAE.

4.7 Aussicht

Eine weitere Untersuchung zur Verifikation der spezifischen im ZNS aktivierten MOG T-Zellen, könnte in Form eines adoptiven Transfers erfolgen. Dabei werden die immunisierten T-Lymphozyten (Th1- und/oder Th17-Zellen) nach der Induktion aus den Versuchstieren extrahiert und einer Wildtyp-Maus, bspw. der Linie C57Bl/6, verabreicht (85). Würden die Tiere nun klinische sowie morphologische Anzeichen einer EAE entwickeln, könnte sicher davon ausgegangen werden, dass die T-Zellen spezifisch aktiviert wurden und auf Grund des „Immunprivileges“ des ZNS bei der zerebral induzierten Immunantwort sich keine „ausreichende“ Entzündung entwickeln konnte.

Das Verständnis der ZNS-vermittelten Immunreaktion bei EAE ist wichtig und kann helfen die Ätiologie von ZNS-Erkrankungen wie beispielsweise der MS besser zu verstehen, um in Zukunft eine richtungsweisende kausale medikamentöse Therapie entwickeln zu können.

5 Zusammenfassung

Bei der chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankung des ZNS, der Multiplen Sklerose, zeigen sich fokale inflammatorische, demyelinisierende Läsionen der weißen Substanz, welche u.a. T-Zellen gegen das körpereigene MOG aufweisen. Klinisch äußert sich die Erkrankung durch verschiedene Symptome wie z.B. Gleichgewichtsstörungen, Lähmungen oder allgemein kognitive Defizite. Die Ätiologie der MS ist weitgehend ungeklärt. Die EAE ist ein Tiermodell für die MS, anhand welcher die Pathogenese der Erkrankung erforscht wird. So wird den Versuchstieren eine Emulsion bestehend aus MOG und CFA subkutan z.B. über den Flanken injiziert. Zur Verstärkung der Immunantwort kann zusätzlich Ptx verabreicht werden, welches die Permeabilität der BHS erhöht. Die MOG-haltige Emulsion führt zu einer Immunreaktion bei welcher u.a. naive CD4⁺-T-Zellen aktiviert werden und zu Th1- bzw. Th17-Zellen differenzieren. IL-12 bewirkt dabei die Differenzierung der naiven T-Zellen zu Th1-Zellen, IL-23 zu Th-17 Zellen. Diese MOG-spezifischen T-Zellen können in das ZNS einwandern und dort Myelinscheiden der Neurone zerstören. Die Entzündung findet v.a. im Kleinhirn und Rückenmark statt und äußert sich bei den Tieren in Form von Gleichgewichtsstörungen und Lähmungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion einer EAE insoweit abgewandelt, dass die Immunreaktion nur auf die ZNS-Ebene begrenzt wurde. Hierzu wurde den Versuchstieren mit Hilfe einer stereotaktischen Vorrichtung eine MOG-haltige Emulsion direkt in das Kleinhirnmarklager appliziert. Das Volumen der Emulsion wurde auf 3 µl/ Tier und die MOG-Konzentration auf 37 mg/ml begrenzt. So wurde sichergestellt, dass trotz der geringen Emulsionsmenge genügend MOG-Antigen zur Induktion einer Immunreaktion vorhanden war. Um die Immunantwort auf das ZNS zu begrenzen, musste das periphere Immunsystem „ausgeschaltet“ werden. Dazu verwendeten wir bei dem Experiment die transgene CA-Mauslinie, bei welcher die Untereinheiten des IL-12, p40 und p35, spezifisch nur in den Astrozyten unter transkriptioneller Kontrolle des GFAP-Promotors exprimiert werden. Die p40 Untereinheit ist außerdem ein Teil von IL-23, weshalb bei der CA-Mauslinie die beiden Interleukine 12 und 23 lediglich im ZNS synthetisiert werden können. Dadurch können die naiven T-Zellen im peripheren Immunsystem nicht aktiviert werden.

Insgesamt wurden 88 Mäuse der CA-Tierlinie stereotaktisch am Kleinhirn operiert. Zur Negativkontrolle wurden 14 Mäuse der C57Bl/6-Linie, 17 Mäuse der IL-12p40^{-/-}-Linie und 3

Mäuse der MyD88^{-/-}- Linie operiert. Die klinische Symptomatik der Versuchstiere wurde nach einem EAE-Score beurteilt. Bei langer Beobachtungszeit von maximal 42 Tagen entwickelten nahezu alle Tiere der CA-Linie eine Ataxie sowie häufig ein Kreisen. Diese Symptomatik als Zeichen der stattgefundenen Immunreaktion zu werten ist jedoch schwierig, da die Tiere der CA-Linie auf Grund der transgenen IL-12 Expression ab etwa der 12. Lebenswoche eine spontane Inflammation entwickeln. Einige der Tiere wurden über 30 Tage beobachtet, so dass es wahrscheinlich war, dass sie im Verlauf eine spontane Ataxie entwickeln würden. Darüber hinaus kann der operative Eingriff am Kleinhirn zu einer Verstärkung bzw. zu einem früheren Auftreten der Symptomatik geführt haben. Dauerhafte Lähmungen waren hingegen nicht zu verzeichnen. In den histomorphologischen sowie immunhistochemischen Untersuchungen sahen wir deutliche Entzündungszeichen wie Gewebeauflockerung sowie eine sowohl diffuse als auch lokale, die Injektionsstelle umgebende, Infiltration durch CD4⁺-, CD8⁺-, CD45⁺-Lymphozyten und Makrophagen. In der FACS-Analyse ließen sich nur wenige spezifisch aktivierte T-Zellen nachweisen. Insgesamt konnte bei 0,2-3% der Th1- und Th17-Zellen eine IFN- γ bzw. IL-17 Produktion nachgewiesen werden. In der peripher induzierten EAE lassen sich in frischen Läsionen ebenfalls ähnlich wenige MOG-spezifisch aktivierte CD4⁺-T-Zellen nachweisen.

Zusammenfassend ist die Induktion einer zerebralen Immunreaktion prinzipiell möglich, es zeigt sich jedoch eine deutlich schwächere Immunreaktion im Vergleich zu einer peripher induzierten EAE. Eine Möglichkeit zum Nachweis MOG-spezifisch aktivierter T-Zellen wäre ein adoptiver Transfer. Hierzu extrahiert man die immunisierten T-Lymphozyten (Th1- und/oder Th17-Zellen) nach der Induktion aus den Versuchstieren und verabreicht diese einer Wildtyp-Maus. Würde es infolgedessen bei den Tieren zu EAE-Symptomen kommen, wäre eine spezifische T-Zellaktivierung sicher nachgewiesen.

Im Großen und Ganzen kann das Verständnis der zerebralen Immunreaktion entscheidend für eine richtungsweisende Therapie bei autoimmunen ZNS-Erkrankungen wie der MS sein.

6 Summary

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune inflammatory disorder of the central nervous system (CNS) showing focal demyelinating lesions of the white brain substance which contain T-cells against the endogenous myelin oligodendrocyte protein (MOG). There are different clinical disease's symptoms such as impaired balance, paralysis or in general cognitive deficits. The exact aetiology of the MS remains unknown. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model for the MS which allows to examine the disease's pathogenesis. The laboratory animals get injected subcutaneously above the flanks with an emulsion consisting of complete Freund Adjuvans (CFA) and MOG. In order to intensify the following immune reaction, it's possible to administer additionally Pertussis toxin (PT) which is known to enhance the permeability of the blood-brain-barrier (BBB). The MOG-containing emulsion leads to an immune response activating naïve CD4+T-cells which differentiate towards Th1- and Th17-cells. These MOG-specific T-cells are now able to migrate into the CNS and destroy the neuron's myelin sheaths. The inflammation is located in the cerebellum and the spinal cord of the animals who consequently develop impaired balance and paralysis.

In this work the induction of the EAE was modified so far as the immune reaction was limited to only the CNS level. To this, the MOG-containing emulsion was injected with help of a stereotactic device directly into the cerebellum of the laboratory mice. The emulsion's volume was limited to 3 µl/mouse and the MOG concentration to 37 mg/ml. Thus it was guaranteed that despite of the low emulsion's volume there was still enough MOG-antigen to induce an immune reaction. In order to limit the immune response to the CNS, it was necessary to "turn off" the peripheral immune system. For this, the transgenic mice of the CA-line were used in the experiment. They express specifically the subunits of the IL-12, p35 and p40, under transcriptional control of the GFAP-promotor only in the astrocytes. The p40 subunit is also a part of IL-23 which is why both interleukins 12 and 23 may be synthesised only in the CNS. Thus, the activation of the naïve CD4+T-cells in the peripheral immune system is no longer possible.

Stereotactic cerebellum surgery was performed on 88 mice of the CA-line. 14 mice of the C57Bl/6-line, 17 mice of the IL-12p40^{-/-}-line and 3 mice of the MyD88^{-/-}-line received surgery as well and served as negative control. The animal's clinical symptoms were evaluated by an EAE score. Within the time of observation of maximal 42 days nearly all the mice of the CA-line developed an ataxia and often circling. Still it's difficult to evaluate these symptoms as a

sign of a specific immune reaction, as the mice of the CA-line tend to develop a spontaneous ataxia beyond the age of 12 weeks. Some of the mice have been observed over 30 days so it was very likely for them to develop a spontaneous inflammation. Furthermore, the cerebellum surgery might have led to symptom's increase or an earlier onset of the ataxia. Lasting paralysis were not recorded. The histological results and immunochemistry showed clear signs of infection such as dispersed brain tissue and a diffuse local infiltration around the injection spot of CD4+, CD8+, CD45+-lymphocytes and macrophages. Only a few specific activated T-cells could be detected in the FACS-analysis. Altogether 0,2-3% of Th1- and Th17-cells were producing IFN- γ or IL-17. These findings correspond well with the peripheral EAE induction, where similar few specific MOG-activated CD4+-T-cells are found in fresh lesions.

In summary, the induction of cerebral immune reaction is possible but there is a clearly weaker immune response compared to a peripheral induced EAE. In the future, one possibility to prove the MOG-specific activated CD4+-T-cells could be an adoptive transfer. To perform this, immunized T-lymphocytes (Th1- and/ or Th17-cells) should be extracted from the mice after cerebral induction and injected to a wildtype mouse. If there would be any signs of EAE symptoms, a specific T-cell activation would have been proved.

In the big picture, the understanding of the cerebral autoimmune reaction may lead towards a therapy in autoimmune diseases such as MS.

7 Literaturverzeichnis

1. **Ahn DK, Park HS, Kim TW et al.** The degree of bacterial contamination while performing spine surgery. *Asian Spine J.* 2013 Mar;7(1):8-13. doi: 10.4184/asj.2013.7.1.8. Epub 2013 Mar 6.
2. **Alotaibi S, Kennedy J, Tellier R et al.** Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA.* 2004; 291:1875-9.
3. **Alzona M, Jack HM, Fisher RI et al.** IL-12 activates IFN-gamma production through the preferential activation of CD30+ T cells. *J Immunol.* 1995; 154:9-16.
4. **Aranami T, Yamamura T.** Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int.* 2008; 57:115-20.
5. **Bai B, Song W, Ji Y et al.** Microglia and microglia-like cell differentiated from DC inhibit CD4 T cell proliferation. *PLoS One.* 2009; 4:e7869.
6. **Becher B, Bechmann I, Greter M.** Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med.* 2006; 84:532-43.
7. **Begum-Haque S, Sharma A, Kasper IR et al.** Downregulation of IL-17 and IL-6 in the central nervous system by glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2008; 204:58-65.
8. **Belardelli F.** Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS.* 1995; 103:161-79.
9. **Bettelli E, Pagany M, Weiner HL et al.** Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med.* 2003 May 5;197(9):1073-81.
10. **Brahmachari S, Pahan K.** Role of cytokine p40 family in multiple sclerosis. *Minerva Med.* 2008; 99:105-18.
11. **Brombacher F, Kastelein RA, Alber G.** Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol.* 2003 Apr;24(4):207-12.
12. **Bruckner JB, Franke W, Eberlein HJ.** Vergleichende Untersuchungen der pra-, intra- und postoperativen Sauerstoffaufnahme und der Kalorienbilanz während der postoperativen katabolen Phase beim Menschen. *Langenbecks Arch Chir.* 1966; 316:592-3.
13. **Buchholz BM, Billiar TR, Bauer AJ.** Dominant role of the MyD88-dependent signaling pathway in mediating early endotoxin-induced murine ileus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010 Aug;299(2):G531-8. doi: 10.1152/ajpgi.00060.2010.

Epub 2010 May 27.

14. **Burnette WN.** Bacterial ADP-ribosylating toxins: form, function, and recombinant vaccine development. *Behring Inst Mitt.* 1997 Feb;(98):434-41.
15. **Campbell IL, Stalder AK, Akwa Y et al.** Transgenic models to study the actions of cytokines in the central nervous system. *Neuroimmunomodulation.* 1998; 5:126-35.
16. **Cecere TE, Todd SM, Leroith T.** Regulatory T Cells in Arterivirus and Coronavirus Infections: Do They Protect against Disease or Enhance it? *Viruses.* 2012; 4:833-46.
17. **Chastain EML, Duncan DS, Rodgers JM et al.** The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1812:265-74.
18. **Chastain EML, Miller SD.** Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. *Immunol Rev.* 2012; 245:227-38.
19. **Chehimi J, Trinchieri G.** Interleukin-12: a bridge between innate resistance and adaptive immunity with a role in infection and acquired immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 1994; 14:149-61.
20. **Chen Y, Langrish CL, McKenzie B et al.** Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2006; 116:1317-26.
21. **Cohen IR, Schwartz M.** Autoimmune maintenance and neuroprotection of the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 1999; 100:111-4.
22. **Constantinescu CS, Frei K, Wysocka M et al.** Astrocytes and microglia produce interleukin-12 p40. *Ann N Y Acad Sci.* 1996; 795:328-33.
23. **Constantinescu CS, Wysocka M, Hilliard B et al.** Antibodies against IL-12 prevent superantigen-induced and spontaneous relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 1998; 161:5097-104.
24. **Cooper AM, Magram J, Ferrante J et al.** Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med.* 1997 Jul 7;186(1):39-45.
25. **Correale J, Villa A.** The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity.* 2007; 40:148-60.
26. **Cross AH, O'Mara T, Raine CS.** Chronologic localization of myelin-reactive cells in the lesions of relapsing EAE: implications for the study of multiple sclerosis. *Neurology.* 1993 May;43(5):1028-33.
27. **Dake MD.** Chronic cerebrospinal venous insufficiency and multiple sclerosis: history and background. *Tech Vasc Interv Radiol.* 2012; 15:94-100.

28. **Dellaretti M, Reyns N, Touzet G et al.** Stereotactic biopsy for brainstem tumors: comparison of transcerebellar with transfrontal approach. *Stereotact Funct Neurosurg.* 2012; 90:79-83.
29. **Domingues HS, Mues M, Lassmann H et al.** Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One.* 2010; 5:e15531.
30. **Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM et al.** T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol.* 2010; 162:1-11.
31. **Fossiez F, Djossou O, Chomarat P et al.** T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996; 183:2593-603.
32. **Friese MA, Fugger L.** Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain.* 2005; 128:1747-63.
33. **Fu S, Zhang N, Yopp AC et al.** TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant.* 2004; 4:1614-27.
34. **Galea I, Bechmann I, Perry VH.** What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 2007; 28:12-8.
35. **Garn H, Renz H.** Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiology.* 2007;212(6):441-52. Epub 2007 Apr 30.
36. **Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM et al.** Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol.* 1992; 143:127-42.
37. **Ghaffar O, Feinstein A.** The neuropsychiatry of multiple sclerosis: a review of recent developments. *Curr Opin Psychiatry.* 2007; 20:278-85.
38. **Gold R, Linington C, Lassmann H.** Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain.* 2006; 129:1953-71.
39. **Gong J, Stenger S, Zack JA et al.** Isolation of mycobacterium-reactive CD1-restricted T cells from patients with human immunodeficiency virus infection. *J Clin Invest.* 1998 Jan 15;101(2):383-9.
40. **Goverman J.** Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9:393-407.
41. **Gran B, Zhang G, Rostami A.** Role of the IL-12/IL-23 system in the regulation of T-cell responses in central nervous system inflammatory demyelination. *Crit Rev Immunol.* 2004; 24:111-28.

42. **Gyulveszi G, Haak S, Becher B.** IL-23-driven encephalo-tropism and Th17 polarization during CNS-inflammation in vivo. *Eur J Immunol.* 2009; 39:1864-9.
43. **Hatterer E, Davoust N, Didier-Bazes M et al.** How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood.* 2006; 107:806-12.
44. **Hein T, Hopfenmüller W.** Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Nervenarzt.* 2000 Apr;71(4):288-94.
45. **Hofer M, Hausmann J, Staeheli P, Pagenstecher A.** Cerebral expression of interleukin-12 induces neurological disease via differential pathways and recruits antigen-specific T cells in virus-infected mice. *Am J Pathol.* 2004; 165:949-58.
46. **Hohlfeld R.** Multiple sclerosis: human model for EAE? *Eur J Immunol.* 2009; 39:2036-9.
47. **Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM.** Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science.* 1993; 260:547-9.
48. **Jun S, Ochoa-Reparaz J, Zlotkowska D et al.** Bystander-mediated stimulation of proteolipid protein-specific regulatory T (Treg) cells confers protection against experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) via TGF-beta. *J Neuroimmunol.* 2012; 245:39-47.
49. **Kabat EA, Wolf A, Bezer AE et al.** Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *J Exp Med.* 1951; 93:615-33.
50. **Karman J, Ling C, Sandor M et al.** Dendritic cells in the initiation of immune responses against central nervous system-derived antigens. *Immunol Lett.* 2004; 92:107-15.
51. **Kasakura S.** A role for T-helper type 1 and type 2 cytokines in the pathogenesis of various human diseases]. *Rinsho Byori.* 1998; 46:915-21.
52. **Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB et al.** Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med.* 1986; 163:1037-50.
53. **Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J. Brefeldin A:** insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol.* 1992 Mar;116(5):1071-80.
54. **Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T et al.** IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006;

- 177:566-73.
55. **Kosmaczewska A, Swierkot J, Ciszak L et al.** The role of Th1, Th17, and Treg cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis including anti-inflammatory action of Th1 cytokines. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2011; 65:397-403.
56. **Kuerten S, Lehmann PV.** The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis? *J Interferon Cytokine Res*. 2011; 31:907-16.
57. **Kurtzke JF, Hyllested K, Heltberg A, Olsen A.** Multiple sclerosis in the Faroe Islands. 5. The occurrence of the fourth epidemic as validation of transmission. *Acta Neurol Scand*. 1993; 88:161-73.
58. **Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM et al.** IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005 Jan 17;201(2):233-40.
59. **Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C.** Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*. 2001; 7:115-21.
60. **Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF.** The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*. 2007; 17:210-8.
61. **Lassmann H.** Experimental models of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2007; 163:651-5.
62. **Laurence A, Tato CM, Davidson TS et al.** Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*. 2007; 26:371-81.
63. **Lee E, Chanamara S, Pleasure D, Soulika AM.** IFN-gamma signaling in the central nervous system controls the course of experimental autoimmune encephalomyelitis independently of the localization and composition of inflammatory foci. *J Neuroinflammation*. 2012; 9:7.
64. **Leonard JP, Waldburger KE, Goldman SJ.** Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J Exp Med*. 1995; 181:381-6.
65. **Li Y, Chu N, Hu A et al.** Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain*. 2007; 130:490-501.
66. **Lublin FD, Reingold SC.** Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996; 46:907-11.
67. **SE, Hosken NA, Litton M et al.** Dendritic cells produce IL-12 and direct the

- development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol.* 1995; 154:5071-9.
68. **Macatonia SE¹, Hosken NA, Litton M et al.** Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol.* 1995 May 15;154(10):5071-9.
69. **Maier J, Kincaid C, Pagenstecher A et al.** Regulation of signal transducer and activator of transcription and suppressor of cytokine-signaling gene expression in the brain of mice with astrocyte-targeted production of interleukin-12 or experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2002; 160:271-88.
70. **Maugh TH2.** The EAE Model: A Tentative Connection to Multiple Sclerosis. *Science.* 1977; 195:969-71.
71. **Miller SD, Karpus WJ, Davidson TS.** Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol.* 2010; Chapter 15: Unit 15.1.
72. **Miller SD, McMahon EJ, Schreiner B, Bailey SL.** Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1103:179-91.
73. **Mondal S, Roy A, Pahan K.** Functional blocking monoclonal antibodies against IL-12p40 homodimer inhibit adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 2009; 182:5013-23.
74. **Mony JT, Khorrooshi R, Owens T.** Chemokine receptor expression by inflammatory T cells in EAE. *Front Cell Neurosci.* 2014 Jul 4; 8:187. doi: 10.3389/fncel.2014.00187. eCollection 2014.
75. **Mosmann TR, Coffman RL.** TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7:145-73.
76. **Murphy KM, Travers P, Walport M et al.** *Janeway Immunologie.* Heidelberg: Spektrum Akad. Verl; 2009.
77. **Mutis T, Cornelisse YE, Ottenhoff TH.** Mycobacteria induce CD4+ T cells that are cytotoxic and display Th1-like cytokine secretion profile: heterogeneity in cytotoxic activity and cytokine secretion levels. *Eur J Immunol.* 1993; 23:2189-95.
78. **Namba K, Kitaichi N, Nishida T et al.** Induction of regulatory T cells by the immunomodulating cytokines alpha-melanocyte-stimulating hormone and transforming growth factor-beta2. *J Leukoc Biol.* 2002; 72:946-52.
79. **Oppmann B, Lesley R, Blom B et al.** Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000; 13:715-25.

80. **Ota K, Matsui M, Milford EL et al.** T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature*. 1990; 346:183-7.
81. **Pachter JS, de Vries HE, Fabry Z.** The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003; 62:593-604.
82. **Pagenstecher A, Lassmann S, Carson MJ et al.** Astrocyte-targeted expression of IL-12 induces active cellular immune responses in the central nervous system and modulates experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*. 2000; 164:4481-92.
83. **Ponsonby A, van der Mei I, Dwyer T et al.** Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2005; 293:463-9.
84. **Powrie F, Carlino J, Leach MW et al.** A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB (low) CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1996; 183:2669-74.
85. **Rao P, Segal BM.** Experimental autoimmune encephalomyelitis. *Methods Mol Biol*. 2012; 900:363-80.
86. **Raper D, Louveau A, Kipnis J.** How Do Meningeal Lymphatic Vessels Drain the CNS? *Trends Neurosci*. 2016 Sep; 39(9):581-586. doi: 10.1016/j.tins.2016.07.001. Epub 2016 Jul 25.
87. **Rendon JL, Choudhry MA.** Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. *J Leukoc Biol*. 2012.
88. **Rieckmann P.** Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose. *Der Nervenarzt*. 2006; 77:1506-1518.
89. **Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP.** Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med*. 1933; 58:39-53.
90. **Sayetta RB.** Theories of the etiology of multiple sclerosis: a critical review. *J Clin Lab Immunol*. 1986; 21:55-70.
91. **Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG et al.** Cloning and expression of murine IL-12. *J Immunol*. 1992; 148:3433-40.
92. **Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM.** An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J Exp Med*. 1998; 187:537-46.
93. **Segal BM.** The unwavering commitment of regulatory T cells in the suppression of autoimmune encephalomyelitis: another aspect of immune privilege in the CNS. *Eur J Immunol*. 2012; 42:1102-5.
94. **Stalder AK, Pagenstecher A, Yu NC et al.** Lipopolysaccharide-induced IL-12 expression in the central nervous system and cultured astrocytes and microglia. *J*

- Immunol.* 1997; 159:1344-51.
95. **Stefflerl A, Brehm U, Linington C.** The myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG): a model for antibody-mediated demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neural Transm Suppl.* 2000:123-33.
96. **Sternberg Z.** Autonomic dysfunction: A unifying multiple sclerosis theory, linking chronic cerebrospinal venous insufficiency, vitamin D (3), and Epstein-Barr virus. *Autoimmun Rev.* 2012.
97. **Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D et al.** Differential regulation of central nervous system autoimmunity by Th1 and Th17 cells. *Nat Med.* 2008; 14:337-42.
98. **Takeuchi O, Akira S.** MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;270:155-67.
99. **Tienari PJ.** Multiple sclerosis: multiple etiologies, multiple genes? *Ann Med.* 1994; 26:259-69.
100. **Toft-Hansen H, Buist R, Sun XJ et al.** Metalloproteinases control brain inflammation induced by pertussis toxin in mice overexpressing the chemokine CCL2 in the central nervous system. *J Immunol.* 2006 Nov 15;177(10):7242-9.
101. **Touil T, Fitzgerald D, Zhang G et al.** Pathophysiology of interleukin-23 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Drug News Perspect.* 2006; 19:77-83.
102. **Trapp BD, Bo L, Mork S, Chang A.** Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J Neuroimmunol.* 1999; 98:49-56.
103. **Trinchieri G.** Role of interleukin-12 in human Th1 response. *Chem Immunol.* 1996; 63:14-29.
104. **Trinchieri G.** The two faces of interleukin 12: a pro-inflammatory cytokine and a key immunoregulatory molecule produced by antigen-presenting cells. *Ciba Found Symp.* 1995; 195:203-14; discussion 214-20.
105. **Trunin II, Golanov AV, Konovalov AN et al.** Stereotactic radiotherapy and radiosurgery in treatment of patients with deep-seated pilocytic astrocytomas]. *Zh Vopr Neurokhir Im N N Burdenko.* 2012; 76:64-78; discussion 78.
106. **Van der Mei IAF, Ponsonby A, Dwyer T et al.** Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ.* 2003; 327:316.
107. **Vetter M, Hofer MJ, Roth E et al.** Intracerebral interleukin 12 induces glioma rejection in the brain predominantly by CD8+ T cells and independently of interferon-gamma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009; 68:525-34.
108. **Weller RO, Galea I, Carare RO et al.** Pathophysiology of the lymphatic drainage of

- the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiology*. 2010; 17:295-306.
109. **Willer CJ, Dymment DA, Risch NJ et al.** Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:12877-82.
110. **Wolf SF, Sieburth D, Sypek J.** Interleukin 12: a key modulator of immune function. *Stem Cells*. 1994; 12:154-68.
111. **Wu CY, Demeure C, Kiniwa M et al.** IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. *J Immunol*. 1993; 151:1938-49.
112. **Yamawaki Y, Kimura H, Hosoi T et al.** MyD88 plays a key role in LPS-induced Stat3 activation in the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 298:R403-10.
113. **Yao Z, Painter SL, Fanslow WC et al.** Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol*. 1995; 155:5483-6.
114. **Yaswen L, Kulkarni AB, Fredrickson T et al.** Autoimmune manifestations in the transforming growth factor-beta 1 knockout mouse. *Blood*. 1996; 87:1439-45.
115. **Yoshimura A, Muto G.** TGF-beta Function in Immune Suppression. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010.
116. **Yura M, Takahashi I, Serada M et al.** Role of MOG-stimulated Th1 type 'light up' (GFP+) CD4+ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (clone). *J Autoimmun*. 2001; 17.
117. **Zhu J, Paul WE.** CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008; 112:1557-69.

Internetquelle:

118. <http://www.nature.com/ni/journal/v13/n10/images/ni.2406-F3.jpg>

8 Anhang

Nummer des Versuchstieres	1. post-OP Tag	14. post-OP Tag	24. post-OP Tag	Zu- bzw. Abnahme (g)/Tier
198	14,6	15,5	16,1	1,5
195	17	17,3	17,5	0,5
194	23,7	24	24,1	0,4
199	20,5	21	22	1,5
202	15,3	17,3	17,8	2,5
215	15,6	16,5	17,2	1,6
214	15,1	17,2	17,2	2,1
216	19,9	21,2	21,6	1,7
217	21,5	23,9	24,9	3,4
220	17,4	17,9	19,7	2,3
205	19,5	22,3	22,3	2,8
213	23,2	24,1	24,5	1,3
Mittelwert (g)	18,6	19,85	20,4	+ 1,8

Tabelle 3.2 Postoperativer Gewichtsverlauf von Tieren der CA-Linie (n=12) nach Induktion (MOG/CFA). Es zeigt sich bei allen Tieren eine Gewichtszunahme. Zwei Tiere wurden aus der Wertung genommen. Die Tiere (n=4), die bis zum 12. postoperativen Tag beobachtet wurden, sind nicht in der Wertung aufgeführt.

Versuchstier #	Tag 1 (g)	Tag 14 (g)	Tag 24 (g)	Zu- bzw. Abnahme (g)/Tier
Bl 6 #1	24,4	25,1	25,5	1,1
Bl 6 #2	26	26	27	1
Bl 6 #3	20,4	20	17,2	- 3,2
Bl 6 #4	24,1	24,1	24,5	0,4
Bl 6 #1.1	14,5	15,8	17,3	2,7
Bl 6 #2.1	26,2	25,7	25,9	-0,3
Bl 6 #3.1	21,6	23	23,3	1,7
Bl 6 #4.1	23	25,4	25,3	2,3
Mittelwert Bl6	22,525	23,1375	23,25	+ 0,7125
196 (IL12p40^{-/-})	22,1	22,8	24,8	2,7
193 (IL12p40^{-/-})	17,7	18,1	19,3	1,6
197 (IL12p40^{-/-})	23,6	23,5	23,9	0,3
218 (IL12p40^{-/-})	19,3	20,8	22,7	3,4
210 (IL12p40^{-/-})	24,3	24	24,5	0,2
221 (IL12p40^{-/-})	27,1	27,7	27,4	0,3
211 (IL12p40^{-/-})	22,6	26,6	29,1	6,5
219 (IL12p40^{-/-})	24,6	26,6	28,6	4
192 (IL12p40^{-/-})	22,5	25	25,1	2,6
212 (IL12p40^{-/-})	18,5	21,2	21	2,5
Mittelwert IL 12p40^{-/-}	22,23	23,66	24,64	+ 2,41
MyD88 187	31,3	32,7	34,6	3,3
MyD88 185	24,5	24,1	24,7	0,2
MyD88 189	22,4	22,8	24,2	1,8
Mittelwert MyD88	26,066667	26,5333333	27,8333333	+ 1,7666667
Mittelwert Gesamt	23,39	24,3	25,03	+ 1,63

Tabelle 3.3 Gewichtsverlauf der 3 operierten Tierlinien: IL-12p40^{-/-} (n=10), C57Bl/6 (n=8) und MyD88^{-/-} (n=3). Darstellung der Mittelwerte.

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
α-TGF-β	anti-TGF-β
A.dest.	<i>aqua</i> destillata
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AG	Arbeitsgemeinschaft
AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMFZ	Biomedizinisches Forschungszentrum
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C2H3Cl3O2	Chloralhydrat
C57Bl/6	C57 black 6
C6H8O7	Zitronensäure
ca.	circa
CAE	Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFA	Complete Freund-Adjuvans
CH3COOH	Essigsäure
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EAE	Experimentell allergische Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii/aliae
etc.	et cetera

EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FCS	Fetal Calf Serum
Fox-P3	Forkhead-Box-Protein P3
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
GATA	DNA-Sequenz „GATA“
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GF	Glial fibrillary acidic protein
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
h	hour (Stunde)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
hGH	human Growth Factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
HLA-DRB1	Genloci in den Subregionen des HLA
ICOS	Inducible Co-Stimulator
ICS	Intrazelluläre Färbung
IFA	incomplete Freund-Adjuvans
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IVC	individually ventilated cages
JAK-STAT	Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription
KAl(SO ₄) ₂	Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat
kb	Kilobasen
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter

LICOS	ICOS-Ligand
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
m	milli
M	Molar
MAC	Membrane Attack Complex
MBP	Myelin-basisches Protein
med.O2	medizinischer Sauerstoff
MeOH	Methanol
MgCl2	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
mm	Millimeter
MOG	MyelinOligodendrozyten-Glykoprotein
MQ	autoklaviertes Wasser
mRNA	messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MT	Mykobakterium tuberculosis
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
n	nano
Na2HPO4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaJO3	Natriumiodat
NaN3	Natriumazid
NK	Natural killer cells
kDa	Kilodalton
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
pH	pondus Hydrogenii
PK	Proteinase K

PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetat
Ptx	Pertussis Toxin
R	Rezeptor
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
ROR γ T	RAR-related orphan receptor gamma
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
SB	Sodiumborat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sec	Sekunde
SIP	Stock Isotonic Percoll
SMAD	Sma and Mad related protein
SPF	specific pathogen free
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAQ	Thermus aquaticus
T-bet	T-box transcription factor
TE	Tris-EDTA
TGF- β	Transforming growth factor beta
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF Rezeptor
TNF- α	TNF-alpha
Treg	regulatorische T-Zellen
U	Units
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

10 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren

Aigner, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bien, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Dodel, Donner-Banzhoff, Dukatz, Eilers, Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Geks, Gress, Gudermann, Hasilik, Heinis, Hertl, Heverhagen, Höffken, Hoffmann, Hofmann, Hundt, Kalinowski, Kann, Kill, Klose, Koolman, Kuhn, Langer, Lill, Lohoff, Maisch, Mann, Meier, Mennel, Michl, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Nimsky, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Plant, Printz, Rausch, Renz, Richter, Roeper, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schneider, Schofer, Schu, Seitz, Sesterhenn, Seyberth, Skwara, Steinfeld, Steiniger, Sure, Tackenberg, Teymoortash, Vogelmaier, Vogt, Wagner, Waldegger, Walters, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Wündisch, Zettl

Meine akademischen Lehrer in Wien waren die Damen und Herren

Ewers, Millesi, Perisanidis, Pirkel, Russmüller

Meine akademischen Lehrer in Zürich waren die Damen und Herren

Bredel, Grätz, Jacobsen, Obwegeser, Tomasetti, Zweifel

Meine akademischen Lehrer in Straßburg waren die Damen und Herren

Coltescu, Habersetzer, Kopferschmitt

11 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. A. Pagenstecher für das entgegengebrachte Vertrauen ein so spannendes Dissertationsthema bearbeiten zu dürfen sowie seine Geduld und Motivation beim Schreiben dieser Arbeit.

Zudem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Neuropathologischen Labors für die lehrreiche und schöne Laborzeit. Insbesondere danke ich Ginette Bortolussi für alles was sie mir beigebracht hat und für ihre wunderbare aufbauende Art mit Schwierigkeiten umzugehen.

Frau Prof. Dr. Magdalena Huber danke ich für Ihre Hilfe und die Erklärungen bei der Lymphozytenextraktion und die Durchführung der FACS-Untersuchungen.

Ganz großen Dank an meine Freunde, die mir immer wieder Mut zugesprochen haben. Besonders Melissa danke ich für ihre ermunternden Worte und die Freundschaft, auf die ich immer zählen kann.

Ich bedanke mich bei meinen lieben Eltern und meinem Bruder, die immer für mich da sind und einen unerschütterlichen Glauben an mich haben.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Alexander, ohne dessen Unterstützung diese Arbeit nicht zum Abschluss gekommen wäre und meinem kleinen Sohn Carl, der besten Motivation überhaupt. Ihr seid mein größtes Glück.